BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

22.142

PAULO LUIZ DE SÁ JÚNIOR

**LIGANTES DE MIÓCITOS CARDÍACOS PARA A
GLICOPROTEÍNA DE 85KDa (Tc-85) DE *Trypanosoma
cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para a obtenção de título
de Mestre em Ciências, área de concentração:
Bioquímica.

São Paulo
2005

T
544.87
S111L

**“Ligantes de miócitos cardíacos para a
glicoproteína de 85KDa (Tc-85) de
Trypanosoma cruzi”**

PAULO LUIZ DE SÁ JÚNIOR

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

518

Prof. Dr. MARIA JÚLIA MANSO ALVES
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. RONALDO BENTO QUAGGIO
IQ – USP

Prof. Dr. RENATO ARRUDA MORTARA
UNIFESP

SÃO PAULO
28 DE SETEMBRO 2005

“Erros são, no final das contas fundamentos da verdade. Se um homem não sabe o que uma coisa é, já é um avanço do conhecimento, saber o que ela não é”.

Carl Jung (1875-1961)

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**LIGANTES DE MIÓCITOS CARDÍACOS PARA A
GLICOPROTEÍNA DE 85KDa (Tc-85) DE *Trypanosoma
cruzi***

(Dissertação de Mestrado)

**Aluno: Paulo Luiz de Sá Júnior
Orientadora: Prof(a). Dra. Maria Júlia Manso Alves**

São Paulo, 21 julho de 2005.

*A meus pais: Paulo e Glória,
pelo amor, apoio e confiança
que em mim depositaram.*

*Aos meus irmãos: Kenny e Bethannye,
pelos momentos de descontração e pelo
apoio emocional.*

AGRADECIMENTOS

À *Dra. Maria Júlia Manso Alves*, por me aceitar em seu laboratório e pela orientação científica no trabalho.

Ao *Dr. Igor Ferreira de Almeida* por permitir que realizasse parte dos experimentos em seu laboratório, e à *Dra. Heleni Stroeder* pelo auxílio técnico nos experimentos de espectrometria de massa.

Ao *Dr. Cláudio Pereira*, pelo auxílio para obter a porção extracelular da subunidade $\beta 3$ da Na^+, K^+ ATPase recombinante, pelas valiosas discussões científicas.

À *Miryam Marroquin Quelopana*, pelas discussões, críticas científicas, pelos momentos de descontração, pelos protocolos e pela amizade verdadeira.

À *Melissa Regina Fessel*, pelas sugestões mirabolantes, pelas críticas, pela companhia e pela amizade.

A *Célia, Roberto e Marinei*, por manter a organização, provisonamento de meios de cultivo e cultura de células e tripomastigotas, essenciais para a realização desse trabalho e também pela amizade durante esses anos.

À *Alice Martins de Santana*, pelo carinho, pela paciência, e pelos bons momentos juntos.

Aos amigos do laboratório: *Alessandra, Ana Cláudia, Débora, José Roberto, Luís, Marcio Margareth, Renata, Roberto, Ursula* pelo apoio e amizade.

Ao *Fábio*, pelo bom humor e companheirismo.

Ao *Giovane Coutinho* pelas discussões e pela amizade.

Aos meus pais e irmãos: *Paulo, Glória, Kenny e Bethannye* pelo incentivo, dedicação e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (*CNPq*) pela bolsa concedida.

RESUMO	1
ABREVIACÕES	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.2 A Doença de Chagas	5
1.3 Interação Parasito-Hospedeiro	7
1.3.1 Ligantes de Células de Mamíferos para <i>T. cruzi</i>	8
1.3.2 Ligantes de <i>T. Cruzi</i> para Células de Mamíferos	9
1.4 A Família Tc-85	12
1.5 A Na ⁺ , K ⁺ ATPase	13
2. OBJETIVOS	15
3. METODOLOGIA	16
3.1 Cultivo	16
3.1.1 Cultivo de Células	16
3.1.2 Cultivo de Parasitas	16
3.2 Isolamento de Cardiomiócitos	16
3.3 Adesão de Cardiomiócitos	17
3.3.1 Adesão a superfícies tratadas com Poli-Lisina e diferentes proteínas	17
3.3.2 Adesão a matriz extracelular de células LLC-MK2	18
3.3.3 Adesão ao peptídeo J	18
3.4 Adesão de tripomastigotas a Cardiomiócitos	18
3.5 Quantificação de Proteínas	19
3.6 Isolamento da Fração Membranar	19
3.7 Cromatografia de Afinidade	19
3.8 Western-Blot	20
3.9 Separação das Proteínas para Sequenciamento	20
3.10 Análise por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas (LC-MS)	21
3.11 Bioinformática	22
3.12 Extração de RNA total	22
3.13 Síntese de cDNA	23
3.14 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)	23
3.15 Análise de DNA por Eletroforese em Gel de Agarose	23
3.16 Preparação e Purificação do Vetor de Expressão pRsetA	23
3.17 Ligação de fragmento de DNA	24
3.18 Transformação de Bactérias Competentes (DH5α, BL21)	24
3.19 Purificação da Proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal imobilizado	24
3.20 DOT-BLOT	25
3.21 Ensaio de ligação do peptídeo J na subunidade β3 da Na ⁺ , K ⁺ ATPase	26
3.22 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	26
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	27
4.1 Isolamento de Cardiomiócitos	27
4.2 Adesão de tripomastigotas a Cardiomiócitos	29
4.3 Determinação de receptores do peptídeo J em Cardiomiócitos	30

4.4 Identificação do receptor de peptídeo J em Cardiomiócitos	32
4.5 Sequenciamento de ligantes de Pep. J presentes na Superfície de Cardiomiócitos	33
4.6 Clonagem da subunidade $\beta 3$ da Na^+ , K^+ ATPase	35
4.7 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante	36
4.8 Adesão das subunidades $\beta 3$ em peptídeo J e peptídeos correlacionados	38
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7. CURRICULUM VITAE	51

O *Trypanosoma cruzi* expressa um grupo de glicoproteínas de superfície, denominadas Tc-85, que pertencem à superfamília gênica das gp85/trans-sialidases. Nosso laboratório clonou e caracterizou um membro da família Tc85 (Tc85-11), cuja região carboxila terminal (clone Tc-85-1) adere em laminina e em células de mamífero. Usando peptídeos sintéticos, correspondendo em sequência à Tc85-1, caracterizou-se o motivo mais conservado da superfamília gênica das gp85/trans-sialidases (VTVxNVFLYNR), o qual não adere em laminina. Esse motivo foi chamado peptídeo J. Por cromatografia de extratos de membrana de cardiomiócitos em coluna de afinidade contendo peptídeo J, foi isolada uma molécula de 30 kDa identificada como sendo a subunidade $\beta 3$ da Na^+ , K^+ ATPase. A porção extracelular da subunidade $\beta 3$ da Na^+ , K^+ ATPase foi clonada e a interação *in vitro* desta proteína com peptídeo J foi observada. Deste modo, é sugerido aqui que a subunidade $\beta 3$ da Na^+ , K^+ ATPase pode ter um papel importante na interação do parasita com a célula hospedeira.

Abreviações

BSA – albumina sérica bovina

DME – meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

ESI-MS – electrospray ionization-mass spectrometry

FT – eluato total

HEPES – hidroxietil-piperazina-N-2-etano-sulfônico

KHB – fosfato de potássio monobásico 1,2 mM; cloreto de potássio 4,7 mM

PBS – fosfato de sódio 10 mM pH 7,4; cloreto de sódio 150 mM

PMSF – fenilmetilsulfonil fluoreto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SFB – soro fetal bovino

TBS – Tris 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM

TLCK – N-tosil-L-lisinaclorometilcetona

Tris – Tris-(hidroximetilaminometano)

U4 – uréia 4 molar

U8 – uréia 8 molar

1:INTRODUÇÃO

A tripanosomíase Americana ou Doença de Chagas é uma importante infecção parasitária na América Latina em termos de saúde pública e impacto econômico. Estima-se que em nosso continente, desde o México, passando pelo Brasil ao sul da Argentina, haja entre 16-18 milhões de pessoas infectadas e 120 milhões estejam em risco de adquiri-la (Moncayo *et al.*, 1999). A maior parte dos casos de infecção dos seres humanos, ou de outros vertebrados, é produzida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos contaminados por *T. cruzi*: os triatomas. Apesar de haver mais de 100 espécies de triatomas, somente uma dezena de espécies tem importância epidemiológica, como origem regular de infecção humana.

No homem são observados quadros clínicos com diferentes características, alguns sem qualquer manifestação clínica (40%), outros com alterações cardíacas (30-40%), cardíacas e digestivas ou neurológicas (estas, menos frequentes).

É interessante observar que há uma correlação entre formas clínicas e determinadas regiões geográficas. Por exemplo, no Brasil, há predominância de formas cardíacas na Bahia, digestivas em Goiás, mistas em Minas Gerais e assintomáticas no Rio Grande do Sul. No Brasil, estima-se que 75000 pessoas por ano desenvolvem arritmias associadas à doença de Chagas, com um custo devido a implantação de marca passo de ordem de R\$375 milhões/ano (Who,1997). Para essa distribuição, supõe-se que tanto características do parasita (diferentes cepas) como do hospedeiro, estejam envolvidas.

1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* tem um complexo ciclo de vida, que envolve mamíferos e insetos da família Reduviidae, conhecendo-se três estágios distintos. **Epimastigota** e **Amastigota** são formas presentes no trato intestinal dos insetos e dentro de células de mamíferos hospedeiros, respectivamente e que se dividem assexuadamente. **Trpomastigota** é o estado infectivo do parasita e que não se reproduz.

A infecção natural acontece se houver deposição de fezes do inseto infectado durante o repasto sangüíneo, com o parasita ingressando pelas feridas da pele, olho ou mucosas. Depois, o parasita invade células do hospedeiro para sobreviver e se reproduzir. Dentro da célula, o tripomastigota se diferencia para a forma amastigota, a qual se multiplica por

fissão binária e finalmente, se diferencia na forma infectiva. Os parasitas liberados circulam livres na corrente sanguínea, antes de aderir e entrar em outras células, dando origem a outro ciclo de diferenciação e replicação. A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando o inseto exerce hematofagia e ingere tripomastigotas circulantes em mamíferos infectados. Ao longo do tubo digestivo do inseto, os tripomastigotas diferenciam em epimastigotas, que se proliferam e migram através do lúmen intestinal do inseto. Na região terminal do intestino, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) que são eliminados com as fezes e podem infectar o vertebrado (Figura 1). Nos últimos anos, diferentes laboratórios têm descritos formas intermediárias entre esses três estágios clássicos, destacando-se as formas epimastigotas intracelulares, que antecedem o aparecimento de formas tripomastigotas no hospedeiro vertebrado (Almeida-de-Faria *et al*, 1999, Tyler & Engman, 2001).

Além do ciclo natural a transfusão de sangue também é uma importante rota de infecção que pode ser evitada pelo controle de qualidade de sangue dos doadores. São descritos casos de infecção congênita em recém-nascidos de mães infectadas, mas em menor proporção (Miles *et al.*, 2003). Ocasionalmente, também há relatos de transmissão oral da doença pela ingestão de alimentos contaminados por triatomíneos infectados.

Figura 1-Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. OMS (2002)

No vertebrado, o *T. cruzi* é um patógeno intracelular obrigatório e pode potencialmente invadir todos os tipos celulares, exceto neutrófilos, eosinófilos, e hemácias, sendo que alguns tipos são mais susceptíveis à infecção do que outros (Brenner et al., 2000). O uso de células de mamíferos em cultura suporta o crescimento e propagação do *T. cruzi in vitro*, facilitando grandemente o estudo da invasão, diferenciação e replicação desses parasitas. A forma tripomastigota tem a capacidade de infectar o hospedeiro vertebrado, pois consegue penetrar e habitar o meio intracelular inclusive de macrófagos não ativados, resistindo à digestão fagocitária no interior de um vacúolo denominado vacúolo parasitóforo, do qual sai para o citoplasma após 1-2 horas. Epimastigotas e amastigotas por sua vez, podem ser fagocitadas por células fagocitárias profissionais, porém sua destruição em fagolisossomos aborta a infecção. Ressalta-se que amastigotas obtidas *in vitro* também infectam culturas de tecido.

1.2 A doença de Chagas

O processo patológico básico da doença de Chagas é a inflamação. Ocorrem dois tipos de reação inflamatória associada ao *T. cruzi*: uma reação focal, dependente da presença do parasita que surge onde o parasita se multiplica e rompe as células parasitadas e uma reação difusa que ocorre no miocárdio, esôfago e cólon, durante as fases aguda e crônica da infecção.

O parasitismo acentuado nas células de Schwann, pode ser importante fator na destruição de estruturas do sistema nervoso autônomo por atrair para suas vizinhanças a inflamação e o possível comprometimento vascular, resultando daí um papel proeminente na patogenia da doença de Chagas, especialmente nas suas formas digestivas.

Pesquisas feitas em cadáveres de pacientes portadores de miocardite chagásica crônica revelam que o *T. cruzi* não tem preferência pelo coração, pois formas amastigotas foram encontradas em diferentes células e tecidos. Por outro lado, no coração havia a redução do número de neurônios dos plexos nervosos parassimpáticos, além de inflamação intensa difusa e fibrosante, enquanto que nos outros órgãos infectados, as lesões em torno das células parasitadas eram discretas ou ausentes. Assim, o mesmo parasita provoca respostas diferentes no coração e em outros órgãos de um mesmo hospedeiro (Barbosa e Andrade, 1984).

Duas fases distintas podem ser observadas ao longo da doença de Chagas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda, que se manifesta entre 7-10 dias após a infecção representa uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*. As formas amastigotas podem ser encontradas nas secções histológicas de quase todos os órgãos e no interior de vários tipos celulares tais como: fibras musculares lisas esqueléticas e cardíacas, fibroblastos, macrófagos, células gliais, células endoteliais, células de Schwann e neurônios, geralmente acompanhadas de infiltrado mononuclear, congestão aguda e edema. Parasitas intracelulares por vezes são abundantes em adipócitos constituindo a chamada “gordura cinzenta”. A miocardite é a lesão mais freqüente e é muito intensa. Os que falecem por insuficiência cardíaca apresentam coração flácido, congesto, aumentado em volume, com petéquias subendocárdicas. Pode haver linfadenite em linfonodos cardíacos, o que representa um reflexo das alterações ocorridas no miocárdio. Microscopicamente, ocorre infiltrado mononuclear e edema dissociando fibras cardíacas. O infiltrado inflamatório envolve todas as estruturas do coração e estende-se ao endo- e ectopericárdio, onde podem ocorrer densos acúmulos focais. Envolve nervos, sistema excitocondutor e gânglios parassimpáticos da parede atrial. No intestino e esôfago, há parasitismo muscular e dos elementos do plexo de Auerbach, além de densos infiltrados linfocitários ao longo desse plexo, com lesões degenerativas nos neurônios. No encéfalo, ocorre infiltração leucocitária mononuclear das leptomeninges, congestão, hemorragia perivascular no interior da substância nervosa, neurofagia e proliferação glial. Excepcionalmente, os parasitas podem ser encontrados em neurônios. Quando a infecção se dá pela mucosa ocular, observa-se inchaço de uma ou ambas pálpebras do olho infectado (sinal de Romana, 1935) ou quando se dá pela pele, sempre que haja solução de continuidade, o sinal característico é o inchaço no local da infecção, sendo chamado de chagoma. O sintoma mais comum é a febre, mas pode ocorrer também enfartamento de linfonodos, edema subcutâneo, hepato ou esplenomegalia. Após a fase aguda, há a redução global do número de parasitas, mas nos seus sítios de multiplicação em vários órgãos, a reação focal continua (Brener, 2000).

O período compreendido entre as manifestações das fases aguda e crônica, cardíaca ou digestiva, é classificado como forma latente ou indeterminada, caracterizada por lesões inflamatórias microscópicas focais onde parasitas podem ser demonstrados (Brener, 2000).

A cardiopatia chagásica crônica é forma clínica tardia da infecção e possui como sintomas as insuficiência cardíaca, arritmia, e o tromboembolismo. Macroscopicamente, o coração se torna globóide, com a ponta formada pelos dois ventrículos e com os vasos venosos congestionados. Pode haver manchas brancas e planas de espessamento epicárdico (“manchas lácteas”). O miocárdio torna-se amolecido, embora não flácido, e com espessura irregular, com áreas de afinamento que se alternam com áreas hipertrofiadas. Muitas vezes pode apresentar espessura reduzida o que poderia contribuir para explicar a insuficiência cardíaca típica dos chagásicos. Ocorre comprometimento das funções dos órgãos infectados em manifestações digestivas da doença. A prevalência de manifestações digestivas ou cardíacas, depende principalmente da região endêmica, sendo que a forma digestiva é a de maior incidência na região central do Brasil e rara em outras áreas. Cerca de 30% dos indivíduos com sorologia positiva desenvolvem alguma forma de expressão da doença crônica cardíaca, e em torno de 30% desses, as manifestações clínicas serão significativas, associando a conspícua morbidade e mortalidade (Brenner *et al*, 2000).

O controle da propagação da doença de Chagas pode ser feito pelo controle da população dos insetos vetores, intra e peridomiciliares, pelo aperfeiçoamento do método de detecção de parasitas no sangue utilizado para transfusões ou ainda pelo desenvolvimento de fármacos ou vacinas que evitem a internação de tripomastigotas por células do hospedeiro vertebrado. Deste modo, é grande o interesse de avaliar em escala molecular a interação *T. cruzi*-célula hospedeira, na busca da compreensão de mecanismos de adesão do parasita à célula, bem como sua internação. Estes fenômenos são cruciais para a sobrevivência do *T. cruzi*, já que os tripomastigotas não podem sobreviver por muito tempo na circulação (Zingales & Colli, 1985).

1.3 Interação parasita-hospedeiro

Nos processos acima descritos são essenciais as interações parasita-célula hospedeira. Estudos realizados para compreender o fenômeno de invasão mostraram que nele estão envolvidas várias moléculas de superfície de ambas as partes, como sistemas do tipo receptor-ligante (Zingales & Colli 1985 e Burleigh & Andrews 1998)

1.3.1 Ligantes de Células de Mamífero para *Trypanosoma cruzi*

No decorrer dos processos de reconhecimento celular, adesão e penetração, a identificação dos componentes da superfície do *T. cruzi* e da célula hospedeira é de fundamental importância. Sugeriram-se várias espécies químicas envolvidas nesse processo no hospedeiro vertebrado, incluindo componentes da matriz extracelular. Ouaisi *et al.* (1984) mostraram que fibronectina liga-se a tripomastigotas. Sugeriu-se, como hipótese, que a fibronectina, formaria uma ponte entre o parasita e a célula hospedeira. Duas proteínas, uma de 85 kDa e outra minoritária de 58kDa, foram identificadas como sendo os possíveis receptores, presentes apenas em tripomastigotas (Ouaisi *et al.*, 1986a e 1986b). Além disso, a sequência RGD parece estar envolvida no processo, pois a pré incubação de tripomastigotas com RGD diminui a infecção *in vivo* (Ouaisi *et al.*, 1986b, 1988 e 1989). Mais tarde, os mesmos autores observaram que anticorpos dirigidos contra moléculas de colágeno tipos I e III inibem a invasão de células de mamíferos por tripomastigotas e sugerem que o receptor de fibronectina possa se ligar também em colágeno (Velge *et al.*, 1988).

Ortega-Barria e Pereira (1991 e 1992) também observaram a adesão de tripomastigotas em colágeno do tipo I e IV, heparina e heparan sulfato, mas não em outros glicosaminoglicanos (ácido hialurônico e condroitin sulfato). Eles identificaram uma proteína de 60 kDa tripomastigota específica, denominada penetrina, como sendo o receptor de heparina no *T. cruzi*.

Em nosso laboratório, foi observado que anticorpos anti-laminina inibem a invasão e que uma molécula de 85 kDa presente na superfície de tripomastigotas é o receptor de laminina (Giordano *et al.*, 1994 e 1999). Essa molécula pertence à superfamília das trans-sialidases, descrita no item 1.3.2.

Quanto à interação de tripomastigotas com células fagocíticas - além do envolvimento de carboidratos descrito por vários grupos (Araújo-Jorge & de Souza, 1984) Fernandez *et al.* (1993) observaram que anticorpos anti- β integrinas inibem a infecção e a replicação de *T. cruzi* em macrófagos humanos e sugerem que a inibição esteja relacionada com o bloqueio da ligação de fibronectina a macrófagos. Recentemente, Freire-de-Lima *et al.* (2000) demonstraram que a interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos infectados com *T. cruzi* ativam o crescimento do parasita de modo dependente de prostaglandinas E2, TGF- β e atividade de ornitina descarboxilase

em macrófagos. A injeção de células apoptóticas em camundongos infectados aumenta e o tratamento com inibidores da ciclooxigenase reduz a parasitemia.

1.3.2 Ligantes de *Trypanosoma cruzi* para Células de Mamíferos

Algumas proteínas ou glicoproteínas presentes na superfície do parasita também foram relacionadas com os processo de adesão e penetração. Em tripomastigotas, merece destaque um grupo heterogêneo de glicoproteínas de 60 a 250 kDa , pertencente à super-família das trans-sialidades (Colli, 1993; Cross e Takle, 1993; Schenkman *et al.*, 1994; e Frasch, 2000). Tal enzima é expressa em altos níveis em superfície de tripomastigotas, onde se encontra ancorada por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Trans-sialidades transferem, de modo reversível, ácido siálico $\alpha(2\rightarrow3)$ -ligados em β -galactose terminais presentes em aceptores específicos na superfície do parasita, o qual não sintetiza ácido siálico (Colli, 1993).

As Mucinas são aceptores de ácido siálico na reação mediada por trans-sialidase formando um grupo de glicoproteínas O-ligadas, de 60-200 kDa, ricas em treonina, prolina e serina (Frasch, 2000). A importância do ácido siálico em mucinas já foi demonstrada: a presença de ácido siálico em mucinas promove a invasão celular por tripomastigotas (Schenkman *et al.*, 1993; Franchin *et al.*, 1997). A remoção de ácido siálico de mucinas pode aumentar a infecção de células fagocíticas por tripomastigotas metacíclicos (Yoshida *et al.*, 1999). Além disso, as mucinas ou suas âncoras de GPI podem desempenhar funções importantes na aderência do parasita a macrófagos e produção de óxido nítrico (NO) e citocinas por estas células (De Diego *et al.*, 1997; Camargo *et al.*, 1997a e 1997b). Assim como ocorre em outros tipos celulares (Agrawal *et al.*, 1998), as mucinas podem atuar tanto como moléculas adesivas quanto anti-adesivas, dependendo do estágio do parasita e da natureza da célula alvo.

O estágio de desenvolvimento do parasita regula a expressão das trans-sialidases em tripanosomas. Epimastigotas apresentam a enzima na forma monomérica e com baixa atividade (Chaves *et al.*, 1993), entretanto, a atividade enzimática aumenta quando o parasita atinge a fase estacionária de crescimento e inicia a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (Yoshida, 1983). Os tripomastigotas expressam a trans-sialidase em maior quantidade que os epimastigotas e de forma multimérica ligada à membrana plasmática por meio de uma âncora de GPI sensível à ação da fosfolipase C.

Achados bioquímicos indicam que a enzima não é detectada durante a transformação tripomastigota-amastigota no interior da célula hospedeira, sendo detectada novamente quando novos tripomastigotas são formados, ainda no interior da célula do hospedeira. (Frevert *et al.*, 1992; Rosemberg *et al.*, 1991 e Abuin *et al.*, 2000). No entanto, estudos imunocitoquímicos mostram a proteína na forma amastigota (Souto-Padron *et al.*, 1990; Frevert *et al.*, 1992 e Rosemberg *et al.*, 1991). Os tripomastigotas liberam quantidades significativas de trans-sialidase no citosol de células infectadas e continua sendo expressa pelo tripomastigota no ambiente extracelular sendo constantemente liberada no meio de cultura (Colli, 1993; Rosemberg *et al.*, Schenkman *et al.*, 1992).

A super-família gênica das trans-sialidases contém cerca de 1000 membros, com diferentes graus de similaridade entre si. Existem atualmente diversas formas de classificação dos membros da família das trans-sialidases, dependendo do grau de identidade entre as seqüências, massa molecular e outras características (Colli *et al.*, 1993; Cross e Takle, 1993; Schenkman *et al.*, 1994 e Frasch, 2000). Com a identificação crescente de novos genes pelo projeto genoma de *T. cruzi* ainda não foi descrita até o momento uma classificação permanente.

Membros da família podem ser classificados em duas sub-famílias: a das trans-sialidases, com 140 genes, e a das trans-sialidases-símile, com mais de 700 genes (Frasch *et al.*, 2000). A família das trans-sialidases pode ser dividida em três grupos de acordo com a estrutura e função das proteínas codificadas: TS, TS I e TS-e. Os grupos TS e TS I são expressos em tripomastigotas e estão ancorados por GPI à membrana plasmática. Esses grupos têm duas regiões principais: a região amino-terminal que contém o sítio catalítico e a carboxi-terminal que contém repetições em série de 12 aminoácidos (repetições SAPA). Esses dois grupos diferem essencialmente na região amino-terminal. O grupo TS tem atividade enzimática, ausente no grupo TS I, devido a uma mutação única de tirosina na posição 342 para histidina (Cremona *et al.*, 1995). Deve-se notar que, membros do grupo sem atividade enzimática, ligam-se a β -galactose com a mesma especificidade da trans-sialidase ativa (Cremona *et al.*, 1999). Os membros do grupo TS-e são expressos em epimastigotas, têm baixa atividade enzimática, não são liberados no meio de cultura e não têm o domínio repetitivo SAPA (Briones *et al.*, 1995). Recentemente foi descrito que trans-sialidases contendo as repetições SAPA têm vida média 8-10 vezes maior do que a enzima sem repetições (Buscaglia *et al.*, 1998 e 1999).

Além disso, a presença de SAPA modula a produção de anticorpos contra a região catalítica (Buscaglia et al., 1998).

Os genes similares àqueles codificados pela trans-sialidases, cujos produtos não têm atividade enzimática foram identificados e incluídos na super-família das trans-sialidases e podem ser classificados como genes trans-sialidases-símile (Frasch *et al.*, 2000). Os produtos desse genes apresentam similaridade (30-40%) com a seqüências de aminoácidos das trans-sialidases. Além disso, podem apresentar até 4 cópias completas ou degeneradas das “Asp boxes” (SxDxGxTW), típicas de sialidases, bem como o domínio subterminal VTVxNVFLYNR (seqüência FLY), que é característico de todos os membros da família das trans-sialidases e trans-sialidases-símile (Colli, 1993; Cross e Takle, 1993).

Figura 2: Estrutura geral dos membros das famílias trans-sialidases e tras-sialidase símile

As possíveis funções de membros da super-família das trans-sialidases, além da atividade enzimática, vêm sendo estudadas por diversos grupos. Membros dessa família participam da fuga do vacúolo após a invasão de células de mamíferos (Burleigh e Andrews, 1995), inibem a ativação das vias alternativa e clássica do complemento ao se ligarem em C3b e C4b, evitando a formação da C3 convertase ativa (Norris, 1998) e adesão em componentes da matriz extracelular. (Alves *et al.*, 1986; Abuin *et al.*, 1989; Ouaisi *et al.*, 1986; Lima e Villalta, 1989; Velge *et al.*, 1988; Ortega-Barria & Pereira, 1991; Giordano *et al.*, 1994 e 1999). Alguns grupos sugerem que os resíduos de

carboidrato de algumas dessas glicoproteínas também estejam envolvidos no processo de invasão (Arruda *et al.*, 1989; Ortega-Barria & Pereira, 1992).

1.4 A Família Tc85

Em nosso laboratório uma família de glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* de 85 kDa (Tc85), que se liga a lectina WGA (wheat germ agglutinin), foi isolada de lisado de tripomastigotas, não sendo encontradas nos outros estágios de desenvolvimento do parasita (Katzin e Colli, 1983). Observou-se que um anticorpo monoclonal contra esta glicoproteína, H1A10, reconhece todos os estágios infectivos de *T. cruzi* de diferentes linhagens (Y e CL), independentemente de sua origem: tripomastigotas de insetos, de cultura de células, da corrente sanguínea e derivados de meio axênico (Alves *et al.*, 1986). O monoclonal H1A10 é capaz de inibir a penetração de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK₂) por tripomastigotas, sugerindo a interferência da Tc85 no mecanismo de invasão. É interessante observar que H1A10 não causa lise nem aglutinação do parasita mas impede sua penetração, sugerindo a existência, na célula hospedeira, de receptores para as glicoproteínas de *T. cruzi* (Alves *et al.*, 1986; Abuin *et al.*, 1989).

A clonagem e caracterização de um membro dessa família, Tc85-11, revelou alta similaridade entre a sua seqüência e a de membros da super-família gênica das trans-sialidases (Giordano *et al.*, 1999). O epítipo do anticorpo H1A10 foi caracterizado e a proteína recombinante codificada pelo clone Tc85-11 liga-se *in vitro* em laminina em células de mamífero (Giordano *et al.*, 1999). Assim, aventou-se a hipótese de que a família das trans-sialidases codificaria moléculas de adesão permitindo ao parasita aderir e transpor tanto a matriz extracelular quanto a membrana plasmática.

Peptídeo J que é encontrado na região carboxi-terminal da Tc85-11, contém o motivo mais conservado das trans-sialidases (TxVFLYxR) e tem afinidade por diferentes componentes da célula hospedeira. Recentemente, citoqueratina 18 foi identificada como receptor para peptídeo J presente em células epiteliais de mamíferos (Magdesian *et al.*, 2001). Assim, fomos verificar quais moléculas presentes na membrana celular de células cardíacas poderiam interagir com o peptídeo J na superfície de *T. cruzi*. No trabalho apresentado nesta dissertação, mostramos a interação *in vitro*, do peptídeo J com a subunidade $\beta 3$ da Na⁺,K⁺ ATPase recombinante.

1.5 A Na^+, K^+ ATPase

As bicamadas lipídicas das membranas biológicas são impermeáveis a íons e moléculas polares. A permeabilidade é conferida por 2 classes de proteínas de membranas que constituem as chamadas bombas e canais. De maneira geral as bombas nos mamíferos utilizam a energia liberada pela hidrólise de ATP ou luz, para transportar íons ou moléculas, constituindo o transporte ativo. Canais, permitem que os íons fluam rapidamente através de membranas, constituindo o transporte passivo.

A Na^+, K^+ ATPase ou bomba de Na^+, K^+ é uma ATPase do tipo-P, um complexo enzimático presente na membrana celular de diferentes tipos celulares, incluindo as células cardíacas, que catalisa a hidrólise de ATP acoplada à transferência de Na^+ para o meio extracelular e K^+ para o interior da célula, conforme a equação abaixo:

onde $\text{Na}^+_{\text{intra}}$ e $\text{K}^+_{\text{intra}}$ são íons intracelulares e $\text{Na}^+_{\text{extra}}$ e $\text{K}^+_{\text{extra}}$ são íons extracelulares.

A Na^+, K^+ ATPase é um heterodímero composto por 2 tipos de subunidades: as subunidades α , não glicosiladas de aproximadamente 110 kDa que contém a atividade catalítica e os sítios de ligação para íons, e as subunidades β de 30 a 55 kDa, com função não totalmente estabelecida. Ambas as subunidades são codificadas por uma família multigênica. As seqüências das subunidades- α de várias espécies animais, que são iguais em 98% dos mamíferos, sugerem que essa subunidade contém cerca de oito segmentos de α -hélice trans-membranas e dois grandes domínios citoplasmáticos. A subunidade β tem uma única hélice transmembrana e um grande domínio extracelular (figura 9). Acredita-se que a proteína tenha a composição $(\alpha\beta)_2$, mas não está claro se a estrutura dimerica é necessidade funcional. Aparentemente a subunidade β é necessária para a conformação e transporte do heterodímero para a membrana plasmática. No entanto há vários trabalhos na literatura mostrando baixa quantidade de mRNA da subunidade β em contraste com o alto conteúdo de mRNA detectado para a subunidade α ou a não co-localização das subunidades α e em cortes de tecidos.

Além das subunidades β_1 e β_2 , recentemente se descreveu a subunidade β_3 , também uma glicoproteína de 42-45 kDa (Arystarkhova & Sweadner, 1997) abundantemente expressa em pulmão, mas também presente em fígado e músculo esquelético e em menor

quantidade em rim coração e cérebro. Pode haver ainda uma terceira subunidade protéica (subunidade γ) que acredita-se estar envolvida no controle da velocidade de extrusão e captação dos íons Na^+ e K^+ respectivamente. A figura esquematiza como seria a disposição mais provável do complexo protéico na membrana celular.

Figura 3: apresentação esuemática da estrutura da Na^+ , K^+ ATPase, mostrando as diferentes subunidades.

2:OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar a interação da família Tc-85 com cardiomiócitos isolados de ratos.

Objetivos específicos

- 1) Estabelecer a metodologia de isolamento de miócitos de roedores.
- 2) Identificar um possível receptor para o peptídeo J (região comum aos membros da Tc-85) presente na superfície de cardiomiócitos.

3: METODOLOGIA

3.1 Cultivo

3.1.1 Cultivo de Células

As células LLC-MK₂ (epiteliais de rim de macaco Rhesus) foram mantidas e subcultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco, suplementado com 1,2g/L de NaHCO₃, 5x10⁵ U/L de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina, contendo 10% de soro fetal bovino (DME) a 37°C em estufa umidificada em atmosfera de 5% de CO₂.

Os subcultivos de células foram realizados a partir de monocamadas confluentes. As monocamadas celulares foram lavadas com 10mM de tampão fosfato/150 mM NaCl (PBS) e tratadas com 0,1% de tripsina em PBS contendo 1mM de EDTA por cerca de 2-3 minutos. As culturas foram iniciadas com aproximadamente 3x10⁴ células/cm² em suspensão em garrafas de plástico de 75 cm² de área. Os subcultivos foram feitos a cada sete dias, quando as monocamadas se apresentavam novamente confluentes.

3.1.2 Cultivo de parasitas

Tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y, foram obtidos por infecção de culturas de células LLC-MK₂ conforme metodologia descrita na literatura (Andrews & Colli, 1982).

3.2 Isolamento de Cardiomiócitos

Os animais foram sacrificados por decaptação por se entender que esse método é o que causa menor sofrimento ao animal. Para os experimentos, foram utilizados ratos Sprage Dowley (SD) com 200g de peso em média. Em resumo, o coração foi rapidamente removido da caixa torácica (Claycomb & Pallazo 1980) e a aorta foi canulada e perfundida com uma pressão constante (100 cmH₂O) a 37°C com Tampão Krebs-Henseleit sem cálcio, contendo NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, Hepes 10 mM e glicose 10 mM. Para se reduzir a contaminação bacteriana ou fúngica, o sistema de perfusão foi lavado previamente com álcool etílico 70% e em seguida lavado com 1000 mL de água destilada esterilizada, antes da canulação do coração. A solução tampão foi filtrada (filtro de 0,2-µm) e equilibrada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ por pelo menos 20 minutos antes do uso.

A digestão enzimática foi iniciada por adição de collagenase tipo II (0,5mg/mL Sigma). Quando o coração se tornou descorado e rígido, aproximadamente 5 minutos após iniciada a digestão, foi adicionado 50mM de EGTA. Após 40 minutos de digestão, o coração foi removido do sistema e cortado em vários fragmentos. O sobrenadante contendo os cardiomiócitos em suspensão foi filtrado em gaze em tubo estéril, centrifugado por 500 rpm por 5 minutos e o precipitado de células foi lavado mais 3 vezes em meio DME suplementado com antibióticos (1% penicilina-estreptomicina). Os critérios para avaliação da viabilidade dos cardiomiócitos foram: 1) forma, que deveria ser alongada para a maioria das células, observando-se poucas células arredondadas; 2) estriações sarcoméricas claramente definidas; 3) estado quiescente, ou seja ondas de contrações espontâneas, por pelo menos 5 minutos (Ying-Ying, 2000).

Foi feita também a incubação das células com azul de Trypan 0,2% para que se pudesse avaliar a viabilidade das células.

3.3 Adesão de cardiomiócitos

3.3.1 Adesão a superfícies tratadas com Poli-lisina e diferentes proteínas

Como os cardiomiócitos isolados não aderem a superfícies que não tenham passado por um tratamento com componentes da matriz extracelular ou com substâncias carregadas, uma série de substâncias foram testadas para que se pudesse avaliar a adesão de cardiomiócitos a superfícies recobertas com essas substâncias. Todos os ensaios de adesão de cardiomiócitos a essas superfícies tratadas, foram feitos em placas de 8 poços pré-incubados com 500µL de: poli-lisina 0,02mg/mL; laminina 10µg/mL; colágeno 4mg/mL; fibronectina 1µg/µL por 12 horas a 37°C e sob agitação constante. Após esse tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS e bloqueadas durante 2h com PBS 1%/BSA.

Após a preparação das placas, foram adicionados cerca de 10^5 cardiomiócitos recém isolados por poço e 2mL de meio DME suplementado com 5×10^5 U/L de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas a 37°C em estufa umidificada e em atmosfera de 5% de CO₂. Como controle negativo, utilizou-se um poço recoberto com 30µg de albumina.

3.3.2 Adesão a matriz extracelular de células LLC-MK2

Células de rim de macaco (LLC-MK2) foram cultivadas em placas de 8 poços como descrito acima. Após 24 horas, a matriz extracelular foi preparada como descrito a seguir e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Células epiteliais de rim de macaco Rhesus (LLC-MK₂) foram crescidas em meio DME por 4 dias até a confluência. As células foram lavadas 3 vezes com PBS, para retirar meio de cultura remanescente e em seguida foram deixadas em contato com água estéril até que todas se tornassem esféricas e se desprendessem da matriz. As células foram desprezadas e o processo foi repetido por mais duas vezes, até que todas as células fossem removidas. Para os estudos de adesão, foram adicionados cerca de 10⁵ cardiomiócitos como descrito. Quando necessário, a matriz extracelular foi solubilizada com 500µL de n-octil-glicopiranosídio 100mM, concentrado por liofilização e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 9%.

3.3.3 Adesão ao peptídeo J

Numa placa com 8 poços, 30µg de peptídeo J (ou outro peptídeo de interesse) em 200µL de DMSO 10% (em água) foram secos durante a noite a 37°C com agitação, lavados com PBS e os poços bloqueados com PBS/1%BSA durante 2 h. Foram adicionadas cerca de 10⁵ células aos poços contendo os peptídeos de interesse e incubados por 8 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após este tempo, lavaram-se os poços 3 vezes com DME 10% SFB. Como controle negativo, foram utilizados poços recobertos com 30µg de albumina.

3.4 Adesão de tripomastigotas a Cardiomiócitos

Em tubo eppendorf, foram adicionados cerca de 3×10⁵ cardiomiócitos/mL em meio DME 2% SFB e 3×10⁸ tripomastigotas, na proporção de 100 tripomastigotas para cada cardiomiócito. Essas células foram incubadas por 8 horas a 37°C em tensão de CO₂, após o quê uma alíquota de 2 µL foi colocada em lâmina, corada com Hoechst e observada ao microscópio de epifluorescência. Outra alíquota contendo cerca de 6×10³ células foi

aderida em lâmina por centrifugação em citocentrífuga (Citospin) a 1000 rpm por 5 minutos e em seguida corada por Rosenfeld (Rosenfeld, 1947).

3.5 Quantificação de Proteínas

O doseamento de proteínas foi feita pelo método de Lowry (Hartree, 1972).

3.6 Isolamento da fração membranar

As frações de membranas foram preparadas de acordo com Brown *et al.* (1990). Em resumo, as células foram obtidas por perfusão do coração com collagenase, lavadas 3 vezes com PBS e lisadas por sonicação em tampão contendo sacarose 250 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, TLCK 1 mM e aprotinina 2,8 µg/mL. A suspensão foi centrifugada a $1500 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi centrifugado a $100.000 \times g$ por 1 hora, sendo que o precipitado foi solubilizado em tampão fosfato contendo n-octil- β -D-glicopiranosídeo ou 0,5% NP-40. Os componentes insolúveis foram separados por centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios de cromatografia de afinidade em coluna contendo peptídeo J . Quando desejado, as proteínas de superfície dos cardiomiócitos isolados foram biotinizadas com EZ-Link-Sulfo-NHS-Biotinylation Kit, como recomendado pelo fabricante.

3.7 Cromatografia de afinidade

Peptídeo J foi sintetizado com uma cisteína adicional no grupo amino terminal pelo grupo do Dr. Luiz Juliano e Dra. Maria Juliano (UNIFESP). O peptídeo J foi imobilizado numa matriz sólida (Ultralink Iodoacetil, Pierce) e usado para experimentos de cromatografia de afinidade (J-matriz) como descrito em Magdesian *et al.* 2001. Os componentes de membranas solubilizados em β -D-n-octil glicosídeo ou NP-40, foram incubados durante a noite com J-matriz a 4°C sob agitação. Em média, 650µg de proteínas foi adicionada por coluna. As colunas foram lavadas exaustivamente com 25mM de β -D-n-octil glicosídeo ou 0,5% NP-40, em tampão PBS. Em seguida, as colunas foram eluídas sucessivamente com NaCl 1M, uréia 4M e 8M, a temperatura ambiente. Dependendo dos experimentos, concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8M de NaCl

foram utilizados. As frações coletadas foram dializadas, concentradas e analisadas por SDS-PAGE.

Como controle, foi utilizada também uma coluna contendo somente a matriz sólida também uma coluna contendo matriz sólida para que se pudesse avaliar se a ligação inespecífica de proteínas de membrana de cardiomiócitos à matriz. Antes da sua utilização, essa coluna foi bloqueada por 16 horas com solução de PBS 1 % de albumina.

3.8 Western-Blot

Após separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida 9%, contendo SDS (SDS-PAGE), os géis foram colocados sobre membranas de nitrocelulose e submetidos a eletroforese em solução aquosa contendo Tris-base 25mM (pH8,3), glicina 150mM e metanol 20% por 16 horas a 20V. Após esse período, a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foi removida e corada com uma solução contendo Ponceau 0,2% em ácido acético 0,1% e água, para identificação dos marcadores de peso molecular. Essa membrana foi lavada com TBS (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,2) e incubada com tampão de bloqueio contendo PBS/BSA por 2h, seguindo de 18h de incubação a 4°C com o anticorpo de interesse. Foram usados anticorpos anti-citoqueratina 18 (TROMA-2 e KS-B17-2, Sigma) na diluição de 1/1000, anti-desmina (DE-U-10, Sigma). Após 2 horas de incubação, a membrana foi lavada por três vezes com TBSTT (TBS suplementado por 0,5% de Triton X-100 e 0,3% de Tween 20) por 10 minutos e incubada por mais 2h com anticorpo secundário conjugado a peroxidase em solução bloqueadora à temperatura ambiente. Essa membrana foi lavada e revelada por quimioluminescência (ECL Kit, Amersham Biotec.).

3.9 Separação de Proteínas para Seqüenciamento

Utilizou-se para eluir da coluna de afinidade contendo o peptídeo J, concentrações crescentes de NaCl (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1M) e uréia 8M, ambos em 0,25M de n-octilglicopiranosídeo/PBS pH 8,0. Após diálise e concentração, os eluatos foram aplicados em gel de poliacrilamida 9% e submetidos a uma tensão de 60V por aproximadamente 3 horas. Em seguida o gel foi imerso em solução contendo 50% de metanol, 0,05% de formalina e incubado por 12 horas. O gel foi tratado 3 vezes, por 20

minutos com etanol 35%, sensibilizado com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ por 2 minutos e lavado com água por 3 vezes, 5 minutos. As proteínas contidas no gel foram tratadas com solução contendo 0,2% AgNO_3 , e formalina 0,076% por 20 minutos. O gel foi lavado com água 2 vezes, por 1 minuto cada lavagem. Para visualização das proteínas, o gel foi imerso em solução contendo 6% de Na_2CO_3 , 0,05% de formalina e 0,0004% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, pelo tempo necessário para que se pudessem visualizar as proteínas. Quando as proteínas se tornaram visíveis, o gel foi imerso em solução contendo 50% de metanol e 12% de ácido acético por 5 minutos para parar a reação.

As bandas de interesse foram recortadas com uma lâmina de bisturi estéril, cortadas em cubos e transferidas para tubos de microcentrifuga. Os pedaços de gel foram imersos em acetonitrila por 15 minutos, centrifugados para se eliminar o excesso de líquidos, secos em centrifuga a vácuo, imersos em 10 mM de ditioeritritol/0,1M de NH_4HCO_3 e incubados por 30 minutos a 56°C. Após a remoção do sobrenadante, foi adicionado acetonitrila com 55 mM de iodoacetamida /0,1M NH_4HCO_3 e incubou-se por 20 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. Após a remoção solução de iodoacetamida lavaram-se as partículas de gel com 200 μL de 0,1M NH_4HCO_3 por 15 minutos. O líquido sobrenadante foi removido e as partículas de gel foram secas em centrifuga a vácuo.

O gel seco foi incubado com 12,5 ng/ μL de tripsina em tampão contendo 50mM NH_4HCO_3 , 5mM de CaCl_2 , a 4°C por 45 minutos, seguido de digestão a 37°C por 12 horas.

3.10 Análise por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas (LC-MS)

Toda a análise para identificação das proteínas foi feita pelo grupo do Prof. Igor de Almeida. Abaixo, uma descrição da metodologia utilizada por eles.

Os peptídeos liberados foram separados por nano HPLC (LC-Packings) e analisados por *electrospray ionization-mass spectrometry* (ESI-MS), utilizando um espectrômetro de massas LCQ-Duo ESI-ion trap-MS (Thermo Finnigan), equipado com nanofonte. Os peptídeos tripticos diluídos (~100 fmol; 4 μL) foram aplicados a uma coluna capilar de fase reversa C18 PepMapTM (300 μm o. d. x 50 μm i.d. x 15 cm, LC Packings), que foi em seguida lavada com 10 μL de 0,1% de ácido fórmico em fluxo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. A

elução foi realizada em fluxo de 200 nL/min, em gradiente de 5% de acetonitrila-0,05% de ácido fórmico (solvente A), a 80% de acetonitrila-0,04% de ácido fórmico (solvente B) (5% b, 3 min; 5-35%B, 29 min; 35-80% B, 3min; 80% B, 4 min; e 5% B, 11 min). O eluato foi introduzido diretamente no LCQ-Duo ESI-ion trap-MS. Para ESI-MS a voltagem da fonte e do capilar foram mantidas a 1,9kV e 3V respectivamente. Para ESI-MS/MS, foi utilizada uma energia normalizada de colisão de 35% (1,8V). Os espectros foram analisados utilizando o programa Turbo Sequest (Thermo Finnigan).

3.11 Bioinformática

As seqüências de aminoácidos e peptídeos foram obtidas em bancos de dados no Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) e analisados por diferentes variantes do programa BLAST em banco de dados de disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análises de seqüências e a determinação dos oligonucleotídeos utilizados para PCR foram feitas no programa Vector MTI 9.0 (Informax).

3.12 Extração de RNA total

200mg de tecido cardíaco de rato foram homogenizados em 2mL de reagente de Trizol™ (Gibco BRL). Após a lise e incubação (5 minutos à temperatura ambiente) das células com o reagente, foram adicionados 200µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol™, o extrato agitado gentilmente e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. As frações aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação (12000g, 15 min., 4°C) e o RNA da fase aquosa foi precipitado com isopropanol (0,5mL/1 mL de Trizol™) e após 10minutos à temperatura ambiente, foi submetido a centrifugação (12000, 10 minutos, 4°C). O precipitado de RNA foi lavado com etanol 75%, com centrifugação de 7500g por 5min. a 4°C. Após secagem de 5-10 minutos à temperatura ambiente, o precipitado foi dissolvido com 200µL de água livre de RNase e incubado por 10 minutos a 56°C.

3.13 Síntese de cDNA

Utilizando-se do RNA extraído (3 µg), juntamente com o Oligonucleotídeo (dT)₂₀ o cDNA dos RNAs poli-A + (mRNA) foi sintetizado utilizando-se o kit ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante.

3.14 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Utilizaram-se 3 quantidades diferentes de cDNA (0,5; 1 e 5 µL) de um volume total de 20µL; 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, 5 unidades de Taq; 2,5 mM de Mg⁺⁺; 0,2 mM de cada dNTP para um volume final de 50µL. Os oligonucleotídeos utilizados foram: ATPforbam: 5' GGATCC GTCATGCTCCAGACTCTGAA 3' (Sítio *Bam HI*)
ATPrevkpn: 5' GGTACC CCTAAGGCATGTGCTATGACT 3' (Sítio *Kpn I*)

Os ciclos de PCR utilizados foram: um ciclo de 1min./95⁰C; trinta e cinco ciclos de 1min./95⁰C; 1min./56⁰C; 1min./72⁰C; e um ciclo de 10min./72⁰C. Foi obtido um produto de aproximadamente 676 pb correspondente à região que codifica para o domínio extracelular da subunidade β3 da Na⁺, K⁺-ATPase. O produto obtido foi digerido com *Bam-HI* e *Kpn-1*.

3.15 Análise de DNA por Eletroforese em gel de agarose

Os DNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Os géis 1% m/v foram preparados com tampão TAE (Sambrook *et al.*, 1998) contendo brometo de etídio 0,1µg/mL para visualização do DNA sob a luz UV.

3.16 Preparação e purificação do vetor de expressão pRset A

O fragmento de DNA correspondente ao vetor digerido foi fracionado em gel de agarose preparativo. A banda de interesse foi cortada e colocada em tubos de 1,5mL e o DNA recuperado usando o kit In Concert Rapid Gel Purification System (Qiagen), segundo o protocolo do fabricante.

3.17 Ligação dos fragmentos de DNA

50 ng do produto do item anterior foram ligados a fragmentos da ATPase previamente digeridos com *Kpn-1* e *Bam-HI* em diferentes relações molares (1:1; 1:3). Utilizaram-se 5

unidades de T4 DNA-ligase e tampão (Promega) para um volume final de 10µL. Esse produto foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH-5α ou BL21 competentes.

3.18 Transformação de bactérias competentes (DH5α, BL21)

As células competentes foram preparadas segundo o método de Hanahan (Hanahan *et al* 1990). Para a transformação, 50 µL de células competentes foram misturadas com o DNA (no máximo 5µL de DNA) e incubadas em gelo por 10-20 minutos. Após esse período, aplicou-se choque térmico a 42°C por 90 segundos seguido de resfriamento em gelo por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 500µL de meio LB e crescidas por 45 minutos a 37°C sob agitação. As bactérias foram centrifugadas, ressuspensas em 100 µL de LB plaqueadas em LB-Ágar com ampicilina (100 mg/ml).

3.19 Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal imobilizado

Para preparação de proteína recombinante em maior escala, preparou-se um inóculo com bactérias BL21 transformadas. Assim, 50mL de meio foram inoculados com material proveniente de uma colônia única e cultivados sob agitação por uma noite. Com essa cultura inoculou-se 1 litro de meio LB (suplementado com ampicilina e cloranfenicol) e se deixou sob agitação a 37°C até atingir Abs_{600nm} de 0,5 a 0,8. Acrescentou-se IPTG (1 mM de concentração final) e o cultivo foi mantido por mais 3 horas. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação (5.000 rpm por 15 minutos a 4°C).

O precipitado de bactérias foi ressuspendido em 10 mL de tampão de solubilização (8M uréia; 50 mM Tris-Cl pH 8,0; 0,5 M NaCl; 5 mM imidazol; 5 mM β-mercaptoetanol) e mantido em agitação por 4-16 horas à temperatura ambiente. O solubilizado foi clarificado a 5.000g por 15 minutos e carregado na coluna ativada com níquel (Ni-NTA Superflow/Qiagen). Após ligação da amostra na resina foi feito um processo de “refolding” da proteína recombinante lavando sucessivamente a coluna com 5 volumes das seguintes soluções: a) 8M b) 4M e c) 2M de uréia em 50 mM Tris-Cl pH 8,0 e 0,5M NaCl. A coluna foi lavada com solução de lavagem (40 mM imidazol, 0,5 M NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 8,0) com fluxo de 1 mL/min a proteína recombinante foi eluída

com tampão de eluição (0,5 M imidazol, 0,1 M NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 6,0) em fluxo de 0,5mL/min e coletando-se frações de 1mL.

3.20 DOT-BLOT (Overlay)

Aplicaram-se 0,1 nmoles dos peptídeos J, mini-J, J-Ala e K, no aparelho para testes imunoblot (BIO-RAD), contendo uma membrana de nitrocelulose e acoplado a uma bomba de vácuo. Após a completa absorção dos peptídeos, cada poço foi lavado com 30μL de TBS-TT. Após a secagem, a membrana foi bloqueado com TBS-TT 1% BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi dividida em 4 partes iguais contendo os 4 peptídeos. 0,2 nmoles das proteínas a serem testadas foram aplicadas (Na^+ , K^+ ATPase subunidade $\beta 3$, Citoqueratina 18, e a região carboxi-terminal da citoqueratina 18) incubando-se por 12 horas a 4°C. Uma das membranas, incubada somente com o tampão foi utilizada como controle negativo. Lavaram-se as membranas 3 vezes com TBS-TT, por 15 minutos cada lavagem e em seguida as membranas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo anti-His-Tag (1/4000) em TBS-TT 1% BSA. As membranas foram lavadas novamente como descrito acima e tratadas com segundo anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina de camundongo, conjugado a peroxidase (1/6000) em TBS-TT 1% BSA por 1 hora à temperatura ambiente, a detecção foi realizada por quimioluminescência usando o kit ECL, conforme orientações do fabricante (Amersham).

3.21 Ensaio de ligação de peptídeo J na subunidade $\beta 3$ da proteína Na^+ , K^+ ATPase

Os peptídeos a serem testados foram fixados em poços das placas (96 poços) incubando-se 100μL da solução 0,1 nmol em tampão carbonato 0,1M pH 9,0 por 16 horas a 4°C. Os poços foram lavados com tampão TBS-T e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 1% BSA em TBS-TT por 1 hora a 37°C. Após a incubação foram feitas 3 lavagens com TBS-TT e foi adicionada a subunidade $\beta 3$ (recombinante) da Na^+ , K^+ ATPase em tampão TBS-TT suplementado com 5mM MgCl_2 , 5 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 e incubada por 1 hora a 37°C. Depois da lavagem com TBS-T, o segundo anticorpo (anticorpo monoclonal anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a

peroxidase) foi incubado por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada 3 vezes com TBS-TT e foram adicionados 100µL de solução reveladora contendo o substrato OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) 10µg/mL em 50 mM de ácido cítrico, 100 mM de Na₂PO₄ e 0,0003% H₂O₂ pH 5,0. A cor foi desenvolvida em 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi detida por adição de 100µL de 2N H₂SO₄. A ligação da proteína recombinante nas moléculas testadas foi quantificada a 492nm num leitor de ELISA (Titer Tek, Co.).

3.22 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram feitas segundo protocolo de Laemmli descrito em Sambrook e colaboradores (1989). Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com 0,25% de “Coomassie Brilliant Blue” em 50% metanol (10 minutos) e descoradas com 7% de ácido acético em 20% de etanol por 1-2 horas à temperatura ambiente.

4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de Cardiomiócitos

Combinando procedimentos relatados em literatura, otimizamos um método que possibilita a obtenção de cardiomiócitos isolados de ratos adultos.

Rotineiramente obteve-se quantidade superior a 1×10^6 células por animal sacrificado, com morfologia característica (células achatadas, tendendo a serem retangulares) e viabilidade em torno de 80%, determinada por coloração.

Para observar a infecção em cardiomiócitos por formas tripomastigostas de *T. cruzi*, tornou-se necessário a obtenção de culturas primárias destas células.

Em experimentos preliminares várias substâncias foram empregadas com o intuito de aumentar a adesão de cardiomiócitos a superfícies. Foram utilizadas laminina, fibronectina, poli-lisina, colágeno tipo II, soro fetal bovino e matriz extracelular de células LLC-MK₂ assim como diferentes combinações dessas moléculas. Os gráficos abaixo (figura 4) demonstram a adesão dos cardiomiócitos às superfícies tratadas com diversas substâncias discutidas em Metodologia.

Figura 4: adesão de cardiomiócitos a superfícies tratadas com diferentes moléculas na ausência (a) e presença (b) do peptídeo J. Legenda: S: soro; F: fibronectina; L: laminina; P: poli-lisina ; L: laminina; J: peptídeo J.

O gráfico “a” ilustra a adesão das células nos diversos substratos sem a adição do peptídeo J e em “b”, mostra-se o mesmo experimento mas agora com a adição do peptídeo J com exceção dos ensaios de adesão a albumina.

As células foram observadas ao longo do tempo (2,4,6 e 8 horas), sendo que um maior número de células aderidas em qualquer condição foi observado após 6 a 8 horas de cultivo. Observou-se um maior número de células aderidas a placas recobertas com poli-L-lisina seguida de laminina, fibronectina e matriz extracelular obtida a partir de culturas de células LLC-MK₂. Não se observou adesão de células quando as placas foram tratadas com colágeno. No entanto, os melhores resultados para aderência dos cardiomiócitos à superfície, foram observados em placas comerciais, pré-tratadas com poli-lisina, para cultura primária, onde um maior número de células aderidas puderam ser notadas (resultados não mostrados). A figura 5 mostra cardiomiócitos aderidos a lamínula de vidro recoberta com poli-lisina após 24 horas de cultura e corados pelo método de Rosenfeld.

Os cardiomiócitos foram mantidos em cultura por até 72 sem alteração aparente em sua morfologia e viabilidade.

Figura 5: cardiomiócitos cultivados por 24 horas e corados pelo método Rosenfeld (aumento

4.2 Adesão de tripomastigotas a Cardiomiócitos

Após a incubação de tripomastigotas com cardiomiócitos, e após sucessivas lavagens, as células foram fixadas, incubadas com Hoechst e uma alíquota de células foi observada ao microscópio de fluorescência. Foi possível observar várias formas tripomastigotas aderidas à superfície dos cardiomiócitos, como mostra a [figura 6](#). O mesmo resultado foi observado após coloração por Rosenfeld (dados não mostrados).

Figura 6: tripanossomas aderidos à superfície de cardiomiócitos após coloração por Hoescht. As setas mostram as formas tripomastigotas aderidas aos cardiomiócitos.

4.3 Determinação de receptores do Peptídeo J em cardiomiócitos

Uma vez que o parasita se liga à superfície de cardiomiócitos de rato adulto preparados no laboratório, foi-se verificar se o peptídeo J, já implicado anteriormente na invasão, interage com proteínas presentes na membrana celular das células cardíacas.

Para se determinar um possível ligante de cardiomiócitos para o peptídeo J, o emprego da metodologia de cromatografia de afinidade foi escolhida. As moléculas de superfície dos cardiomiócitos (1×10^6 células em média por experimento) foram biotinizadas. Após lise mecânica, a fração membranar obtida foi solubilizada com n-octilglicosídeo como descrito em metodologia. Esse extrato foi incubado com a coluna de peptídeo J-Biomatriz e após lavagem exaustiva foram feitas eluições com NaCl 1M/PBS, uréia 4M/PBS e uréia 8M/PBS. A tabela 1 relaciona a quantidade média de proteína contida na fração total de membranas e nos eluatos. Para cada preparação, a quantidade de proteína nas frações de membrana variou de 1mg a 2 mg. Após separação das frações por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, que foi então incubada com estreptavidina acoplada a peroxidase como descrito em Metodologia.

Tabela 1: eluição do extrato de membranas de cardiomiócitos submetidos a cromatografia de afinidade (J-biomatriz)

	Proteína (μ g)	%
Total	2132,00	100,00
Eluato (FT)	1616,20	75,28
NaCl 1M	112,50	5,27
Uréia 4M	105,75	4,95
Uréia 8M	131,25	6,17

Na figura 7a é mostrado o padrão polipeptídico da eluição da coluna que contém o peptídeo J-Biomatriz. Duas bandas principais são observadas nas eluições com uréia 4M e

8M, uma em torno de 50 kDa e outra em torno de 65 kDa. Outras moléculas também são eluídas: uma molécula em torno de 30 kDa, mais abundante na fração de eluição NaCl 1M, mas que aparece também na eluição com uréia 4M e 8M e uma outra com aproximadamente 86 kDa também eluída por NaCl 1M e uréia 8M. Como controle do experimento, foi realizado cromatografia do extrato de cardiomiócitos em coluna contendo apenas a resina de acoplamento, para que se eliminassem as interações inespecíficas entre as proteínas e a resina (dados não mostrados).

Figura 7: Western-Blot de extrato de cardiomiócitos previamente biotinilados e submetidos a cromatografia de afinidade J-Biomatriz. A e B correspondem a preparações distintas. FT-eluito total, NaCl - eluito de cloreto de sódio 1M/PBS, U4-eluito de uréia 4M/PBS, U8-eluito de uréia 8M/PBS.

Na figura 7b é clara a banda de 30kDa eluída com uréia, onde se utilizou extrato de membranas de cardiomiócitos provenientes de 2 ratos adultos (em torno de 2mg de proteínas totais). A figura exhibe perfil protéico com menor número de bandas, quando comparadas com a figura 7a, principalmente no caso da eluição com NaCl 1M. A melhora na metodologia empregada quer na lavagem da coluna antes da eluição com

NaCl 1M/PBS - quer na qualidade da preparação dos cardiomiócitos – pode explicar esses resultados. Outra possibilidade para explicar esses resultados é a maior proteólise no experimento da figura 7b. Ressalte-se no entanto que o padrão de polipeptídeos de 30, 50 e 65 kDa, que são majoritários, é o mesmo em ambos os casos. As bandas observadas nas figuras anteriores se ligam especificamente ao peptídeo em questão (peptídios J), uma vez que não foram detectadas em cromatografia controle, onde a resina, sem peptídeo ligado, foi bloqueada com PBS/albumina 1% e utilizada no mesmo tipo de experimento descrito.

4.4 Identificação dos receptores do peptídeo J em cardiomiócitos

Como proteínas de membranas de células epiteliais em cultura aderem ao peptídeo J (Magdesian et al 2001) fomos verificar que proteínas estariam envolvidas na adesão do parasita às células cardíacas. Já foi demonstrado em cultura de células de rim de macaco, LLC-MK₂ (Magdesian et al, 2001) que citoqueratina 18 está envolvida na adesão do parasita às células epiteliais. Por analogia com as células LLC-MK₂, fomos verificar se o peptídeo J interage com proteínas de filamento intermediário de cardiomiócitos. As células musculares cardíacas, assim como as células musculares estriadas e musculares lisas possuem desmina como constituinte do filamento intermediário (Dagvadorj, A., 2003). Recentemente identificaram-se mutações em desmina de humanos que sofrem de determinadas miopatias e cardiomiopatias, associadas ao acúmulo anormal desta proteína. A geração de ratos desprovidos de desmina em laboratório demonstrou que a ausência de desmina resulta em defeitos ultraestruturais em miócitos e morte celular levando a fibrose e calcificação do miocárdio (Milner, DJ , 1999). Mutações ocorridas em desmina culminam com hipertrofia cardíaca. (Li, 1999). Assim, fomos verificar se havia alguma interação entre o peptídeo J e desmina presente em cardiomiócitos. Para tanto, utilizaram-se frações de membranas de células LLC-MK₂ como controle positivo e lisados de células musculares (cardiomiócitos). Anticorpos anti-citoqueratina (anti-pan CK, Troma-2, KS-B17-2) e anti-desmina (Sigma) foram usados como anticorpos primários. As membranas de nitrocelulose obtidas conforme descrito, foram tratadas com anticorpos e reveladas por luminescência. Não houve reconhecimento de bandas correspondentes a citoqueratinas na cromatografia de extrato de cardiomiócito, porém reconheceram membros da família das citoqueratinas em frações de

células LLC-MK₂. O anticorpo anti-desmina reconheceu uma banda única em membranas contendo proteínas de extrato total de cardiomiócitos, o que não ocorreu em membranas contendo proteínas de extrato de células LLC-MK₂. Isso era esperado pois a desmina é uma proteína característica de células musculares. Cabe aqui ressaltar que o extrato total de cardiomiócitos para esse trabalho foi representado pelo lisado celular solubilizado em 25 mM de n-octilglicopiranosídeo. Como o anticorpo anti-desmina não reconheceu nenhuma banda dos eluatos obtidos em coluna de afinidade contendo o peptídeo J (reconhece a desmina em extrato total), concluiu-se que desmina não é o ligante do peptídeo J.

4.5 Identificação do receptor celular do peptídeo J em cardiomiócito

Como o objetivo principal deste trabalho foi caracterizar o receptor (ou receptores) para o peptídeo J, presente na superfície dos cardiomiócitos, foi feita uma preparação para submeter os peptídeos eluídos da coluna de J-Biomatriz a seqüenciamento e assim permitir a identificação do(s) receptor(es). Optou-se nessa fase, por analisar os polipeptídeos eluídos com NaCl. Para tanto o extrato da fração membrana de cardiomiócitos foi incubado previamente com a resina e o material não absorvido foi cromatografado na coluna contendo o peptídeo J imobilizado. Após as etapas de lavagem o material foi eluído em concentrações crescentes de NaCl (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1M). Cinco bandas majoritárias foram selecionadas para o seqüenciamento.

Figura 8: Eletroforese de proteínas de frações de membranas de cardiomiócitos obtidas por Cromatografia de afinidade em coluna contendo peptídio J (Ultralink Iodoacetil-Pierce) e coradas por prata para sequenciamento. Legenda: A) eluato de NaCl 0,2M; B) eluato de NaCl 0,4M; C) eluato de NaCl 0,6M; D) eluato de NaCl 0,8M; E) eluato de NaCl 1M .

Vários peptídios foram detectados por ESI-MS, mas somente de alguns foi obtido sequenciamento (ESI-MS/MS) com alto grau de confiabilidade. Esses peptídios foram, então, comparados com o banco de dados disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dois desses peptídeos apresentaram identidade (100%) com proteína creatina quinase; outro peptídeo apresentou identidade com o precursor de selectina-E de célula endotelial e um outro peptídeo apresentou identidade com Na^+K^+ -ATPase. Os peptídeos obtidos constam da tabela 2 :

Tabela 2: seqüências polipeptídicas obtidas de extrato de cardiomiócitos cromatografados em colunas de afinidade (J-biomatriz)

Bandas	Seqüências obtidas	Proteína putativa
1	DGDCMFLSKIRLENACMNPYPCICQK	Similar ao receptor NK Ly-49C
2	KEVTIECQIDGTRNLKNKNERDKFLGR	Subunidade $\beta 3$ da Na^+, K^+ -ATPase
3	QAYPFRSGTVCYEVLGEATTDFR	Similar ao receptor de quimioc
4	CTSSGEWSAPAPACHVVECK	Precursor de selectina E
5	LGYLILTCPSNLGTGLR	Creatina quinase

Neste trabalho o interesse primordial é a identificação de proteínas existentes na superfície das células hospedeiras, uma vez que o primeiro contato estabelecido entre o parasita e a célula se dá na membrana plasmática. Portanto, proteínas internas de cardiomiócitos ou moléculas características de célula do sistema imune não foram consideradas. Nossos esforços se concentraram então na Na^+, K^+ ATPase descrita na Introdução.

É importante salientar que o isolamento de proteínas não pertencentes à membrana celular se deu pois na preparação de cardiomiócitos, havia quantidade considerável de células rompidas. Esse fato é uma característica inerente ao método utilizado.

Os estudos focalizaram a Na^+ / K^+ ATPase, visto que em nossos experimentos, esta foi a única proteína presente na superfície celular de cardiomiócitos encontrada.

4.6 Clonagem da subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase

Para estudar a interação do peptídeo J com a subunidade $\beta 3$ da proteína Na^+, K^+ -ATPase *in vitro*, foi sintetizada a proteína recombinante correspondente à subunidade de interesse. Para tanto o RNA presente em células cardíacas foi extraído e utilizado para produção de cDNA e a região correspondente ao domínio extracelular foi amplificada conforme descrito anteriormente.

4.7 Expressão e purificação da proteína recombinante

Após a transformação das bactérias competentes com o plasmídeo recombinante (figura 9) e indução da expressão da subunidade $\beta 3$ da Na^+, K^+ -ATPase, foi observada a expressão da proteína de 30 kDa, utilizando um anticorpo anti-cauda de histidina, uma vez que a proteína foi clonada em fusão com uma cauda de histidina.

Verificou-se entretanto que a proteína encontrava-se insolúvel (no corpo de inclusão). Assim, tratou-se o precipitado obtido após lise com solução de 8 M de uréia em TBS e o material foi analisado por SDS-PAGE, que revelou a presença da proteína, bem como outra banda menor, possivelmente devido a proteólise. Na figura 10 abaixo podemos observar as bandas presentes no extrato total de bactérias. Os números correspondem às frações eluídas da coluna e como podemos observar a proteína recombinante foi eluída nas frações 5,6 e 7.

Figura 9: Vetor de expressão utilizado para transformar *E. coli*

Figura 10 – Expressão da subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase e purificação em coluna de níquel agarose. Precipitado bacteriano contendo a subunidade $\beta 3$ insolúvel foi solubilizado em 8M uréia e purificada em resina Ni-NTA(Agarose). Frações contendo a proteína foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%, revelados por Anticorpo anti-cauda de histidina. À esquerda, padrão molecular em kDa.

Para verificar se a proteína recombinante é reconhecida pelo anticorpo anti-His Tag , o lisado bacteriano e as frações contendo a proteína purificada foram aplicados em SDS-PAGE e depois transferidos para um membrana de nitrocelulose. Essa membrana foi incubada com anticorpo anti-His Tag e posteriormente com o anticorpo anti-IgG conjugado a peroxidase conforme descrito anteriormente. O anticorpo anti-His Tag reconhece a proteína de 30 kDa conforme mostrado na [figura 11](#) abaixo. Uma proteína com massa molecular em torno de 20kDa que aparece no material submetido a cromatografia e na fração não retida na coluna, não é reconhecida pelo anticorpo, indicando que a proteína não

tem cauda de histidina, mas não eliminando a possibilidade de ser resultado de proteólise, com perda da sua cauda de histidina.

Figura 11 – Expressão da subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase e purificação em coluna de níquel agarose. Onde C significa coloração com Azul de Coomassie; NI, extrato de bactérias não-induzidas e I, bactérias induzidas. Precipitado bacteriano contendo a subunidade $\beta 3$ insolúvel foi solubilizado em 8M uréia e purificada em resina Ni-NTA(Agarose). Frações contendo a proteína foram analisadas por SDS-PAGE 12,5%. Na figura A observa-se a proteína de 30 KDa. Na figura B, proteína de 30 KDa revelada com Anticorpo anti-cauda de histidina.

4.8 Adesão da subunidade $\beta 3$ em peptídeo J e peptídeos correlacionados

Para verificar se a proteína ATP $\beta 3$ recombinante interage com o peptídeo J, os peptídeos J (GKKPSVTVTNVFLYNRPLN), J-Ala (VTNVFAYNRPL),

mini-J (VTNVFLYNRPL) e o peptídeo K controle, que não tem relação com o peptídeo J foram imobilizados em membrana de nitrocelulose conforme descrito em Metodologia. As membranas contendo os peptídeos citados e incubadas com a subunidade $\beta 3$, citoqueratina 18 (CK18) ou região carboxi-terminal da citoqueratina 18 (ct-CK18) mostraram que proteína recombinante liga-se ao peptídeo J e ao mini-J, mas não se liga a J-ala ou peptídeo controle (figura 12). Resultado semelhante foi obtido com Citoqueratina 18, como o esperado, uma vez que essa interação já é conhecida. Não foi observada nenhuma reação da porção carboxi-terminal da CK18 com os peptídeo K e J, K e J-Ala, K e mini-J. Não houve reação positiva na ausência de incubação com proteína (CK18, ATP $\beta 3$) de acordo com o controle do experimento.

Figura 12 – Dot-blot: Interação dos polipeptídeos com o peptídeo J. J (peptídeo J), mJ (peptídeo mini-J), K (peptídeo K), Beta3 (subunidade beta3 da Na⁺, K⁺-ATPase), N (ausência de proteínas), ctCK18 (região carboxi terminal da citoqueratina 18). A figura à direita é um esquema do resultado obtido.

No experimento acima foi demonstrado a interação entre o peptídeo J e a subunidade $\beta 3$ Na⁺,K⁺ATPase. O peptídeo controle utilizado nos experimentos não interagiu com a proteína testada, o que já era esperado visto que testes anteriores comprovam a não interação de peptídeo com componentes da membrana celular. Pelo que se pode ver pelas seqüências aminoácidos dos peptídeos acima, o peptídeo J possui duas Lisinas, tendo portanto duas cargas positivas a mais em relação aos outros peptídeos, o que poderia levar à interação do peptídeo

com a subunidade $\beta 3$ da Na^+, K^+ ATPase. Por outro lado, a interação entre mini-J, que não possui essas duas cargas, e as proteínas testadas também ocorre. Nesse caso é esperado que região peptídica responsável pela interação peptídeo/proteína estejam na região da sequência FLY que trocando a leucina dessa sequência por alanina (peptídeo J-ala), a interação não ocorre. Resultados do experimento de “dot-blot” foram confirmados por Elisa. Para tanto, os peptídeos foram fixados em placas de ELISA e foram ensaiados com diferentes concentrações de subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase. Foi verificada resposta dependente de concentração, ou seja, aumentando-se a concentração da subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, aumenta também a interação com o peptídeo J (dado não mostrado). Esse dado, juntamente com dados anteriores, indicam que a interação do peptídeo J com a proteína ATP $\beta 3$ ocorre *in vitro* e pode ser relevante *in vivo* que essa proteína é amplamente difundida entre vários tipos celulares.

Como o complexo protéico é formado sempre por 2 subunidades α e por 2 subunidades β , algumas vezes podendo vir acompanhadas por uma terceira subunidade (γ), e as 3 isoformas conhecidas da subunidade β apresentam cerca de 30 a 50% de identidade entre si ($\beta 3$ e $\beta 1$ tem 34% de identidade; $\beta 3$ e $\beta 2$ tem 47% de identidade) haveria a necessidade ainda de comprovar que o peptídeo J não se liga às subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ da Na^+, K^+ ATPase.

É sabido que o peptídeo J é multiadesivo, ou seja, adere a uma ampla gama de proteínas das células hospedeiras. Seria importante determinar quais são os motivos envolvidos na interação da subunidade $\beta 3$ com o peptídeo J e comparando-se essas sequências de aminoácidos das subunidades β conhecidas, verificar se os motivos de adesão estão nas porções conservadas dessas proteínas. Isso levaria sem dúvida a uma maior compreensão da interação do *T. cruzi* com o coração, um dos órgãos importantes na patologia do chagásico.

5: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Na década de 80, foi demonstrado por nosso laboratório o envolvimento de Tc85, glicoproteína de tripomastigotas e componente da superfamília das gp85/trans-sialidases, no processo de adesão do parasita à célula hospedeira (Alves, 1986). Mais recentemente, foi comprovada a ligação da molécula em laminina, componente de matriz extracelular, bem como a interação entre sua porção carboxi-terminal e célula epitelial (Giordano, 1994, Marroquin-Quelopana, 2004), sugerindo que Tc85 pudesse ser proteína com múltiplos sítios de ligação. Então, foram sintetizados peptídeos mapeando a extremidade final da glicoproteína e, com emprego deles, foi identificado o sítio de adesão da molécula em célula epitelial, denominado peptídeo J, cujo receptor foi caracterizado como sendo citoqueratina 18. Além disso, a adição de peptídeo J ao meio de cultura celular promoveu significativo aumento da infecção por tripomastigotas (Magdesian, 2001) e, adicionalmente, contém em sua sequência o motivo conservado nas trans-sialidases, denominado “FLY sequence”, ainda sem função definida (Frasch, 2000).

Sendo o peptídeo J multiadesivo, com capacidade de ligação a citoqueratina 18, molécula dos filamentos intermediários de células epiteliais, já era de se esperar que houvesse interação dele com moléculas de cardiomiócitos que não fizessem parte da membrana citoplasmática. Além disso, a obtenção das células cardíacas utilizadas para os experimentos provoca a ruptura de muitas delas durante o processo de isolamento, fazendo com que proteínas intracelulares fossem co-purificadas e marcadas por biotilação concomitantemente com proteínas da membrana citoplasmática. Isso pode explicar as diversas bandas que observadas nos géis.

Nesse trabalho a subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase foi isolada. Os experimentos relatados aqui demonstram que ocorre uma forte interação entre a porção extracelular da subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase *in vitro*. (Até o momento não são conhecidos quais aminoácidos da proteína estão envolvidos na adesão ao peptídeo J). Sabe-se que uma molécula existente na superfície de células de Glia e que tem 40% de identidade aminoacídica e a mesma massa molecular das subunidades $\beta 3$ funciona como molécula de adesão (AMOG) nas células Glia (Gloor, S. et al, 1990). Anticorpos que reconhecem as moléculas de adesão na Glia (AMOG) modulam a atividade da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase.

Não foi até agora descrito nenhuma outra forma de interação entre proteínas de *T. cruzi* com a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, sendo os resultados apresentados nesta dissertação, inéditos.

Os dados obtidos nesse trabalho podem auxiliar a compreender o mecanismo pelo qual o *T. cruzi* adere e invade diversos tipos celulares uma vez que a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase está presente em todas células vivas.

Assim, novos estudos envolvendo a interação do peptídeo J com a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase deverão ser realizados para que possamos entender mais sobre esse processo. Desse modo, anticorpos contra a porção extracelular da subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase estão sendo produzidos para se verificar se essa proteína está envolvida na infecção de cardiomiócitos.

Estudos com pequenos peptídeos sintéticos cujas seqüências de aminoácidos englobem toda a região extracelular da subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase poderão ser feitos para que se determine qual ou quais motivos da proteína estão envolvidos na interação com o peptídeo J.

Em suma, o domínio mais conservado da família da gp85/transialidase (peptídeo J) é um importante sítio de adesão do parasita na superfície de células hospedeiras (Magdesian, 2001) e interage com a subunidade $\beta 3$ da $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase presente na superfície de cardiomiócitos.

6: BIBLIOGRAFIA

Abuin, G., Colli, W., Souza, W. & Alves, M.J.M. (1989). A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogenous in expression and molecular constitution. *Mol. Biochem. Parasitol.* **35**, 229-38.

Abuin, G., Freitas-Junior, L. H., Colli, W., Alves, M.J.M. & Schenkman, S. (1999). Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. *J. Biol. Chem.* **274**, 13041-7.

Agrawal, B., Gendler, S.J. & Longenecker, B.M. (1998). The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol. Med. Today* **4**, 397-403.

Alves, M.J.M., Abuin, G., Colli, W. (1986). Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**, 75-82.

Andrews, N.W. & Colli, W. (1982). Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* **14**, 447-51

Araújo Jorge, T.C. & de Souza, W. (1984). Effect of carbohydrates, periodates and enzymes in the process of endocytosis of *T. cruzi* by macrophages. *Acta Trop.* **41**, 17-18.

Arystarkhova, E., Sweadner, K.J. (1997). Tissue specific expression of the Na⁺, K⁺-ATPase β 3 subunit. *J. Biol. Chem.* **36**, 22405-22408.

Berry, M.N., Friend, D.S., & Sheuer, J. (1970). Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circ. Res.* **26**, 679-687.

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

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

Brown, E., hooper, L., Ho, T. & Gresham, H. (1990). Integrin-associated protein: A 50 kDa plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J. Cell. Biol.* **111**, 2785-94.

Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. (1998). Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 461-5.

Buscaglia, C.A., Campetella, O., Leguizamon, M.S. & Frasch, A.C. (1998). The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *J. Infect. Dis.* **177**, 431-6.

Camargo, M.M., almeida, I.C., Pereira, M.E., Ferguson, M.A., Travassos, L.R. & Gazzinelli, R.T. (1997a). Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* **158**, 5890-901.

Camargo, M.M., almeida, I.C., Pereira, M.E., Travassos, L.R. & Gazzinelli, R.T. (1997b). Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN- γ -primed macrophages. *J. Immunol.* **159**, 6131-9.

Chaves L.B., Briones, M.R. & Schenkman, S. (1993). Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **61**, 97-106.

Claycomb, W.C. & Palazzo, M.C. (1980). Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: A light and scanning electron microscope study. *Dev. Biol.* **80**,466-482.

Colli, W. (1993). Trans Sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* **7**,1257-1264.

Cremona, M.L., Campetella, O., Sanchez, D.O. & Frasch, A. C. (1999). Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. *Glycobiology* **9**, 581-7.

Cross, G.A.M. & Takle, G.B. (1993). The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu.Rev Microbiol.***46**, 385-411.

Dagvadorg A., Goudeau B., Hilton-Jones D., Blancato J. K., Shatunov A. , Simon-Casteras M., Squier W., Nagle J.W., Goldfarb L.G., Vicart P (2003). Respiratory insufficiency in deminopathy patients caused by introduction of proline residues in desmin c-terminal α -helical segment. *Muscle and Nerve* **27**,669-675.

De Diego, J., Punzon, C., Duarte, M. & Fresno, M. (1997). Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. *J. Immunol.* **159**, 4983-9.

Ellingsen, O., Davidoff, A.J., Prasad, S.K., Berger, H.J., Springhorn, J.P., Marsh, J.D., & Kelly, R.A. (1993). Adult rat ventricular myocytes cultured in defined medium: Phenotype and eletromechanical function. *Am. J. Physiol.* **265**, H747-H754.

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

Franchin, G., Pereira-Chioccola, V.L., Schenkman, S. & Rodrigues M.M. (1997). Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the

surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infect. Immun.* **65**, 2548-54.

Frasch, A.C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* **16**, 282-6.

Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B.P., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H.C., DeMello, F.G., Dos Reis, G. A. & Lopes, M.F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* **403**, 199-203.

Frevert, U., Schenkman, S., & nussenzweig, V. (1992). Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infect.Immun.* **60**, 2349-60.

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

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

Gloor S., Antonicek, H., Swedner K. J., Pagliusi, S., Frank, R. , Moos, M., Schachner, M. (1990). The adhesion molecule on glia (AMOG) is a homologue of the β subunit of the $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase. *J. Cell. Biol.* **110**, 165-174.

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

Hartree, E. F. (1972). *Anal. Bioch.* **48**, 422-427.

Hjelmeland, L. M. & Chrambach, A.(1984) Membranes, Detergents and Receptors Solubilization. , J. C. Venter and L. C. Harrison, eds, 35, New York, New York.

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

Kirchoff, L.V., & Wilson, M. (1991). Chagas' disease. African trypanosomiasis, leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **4**, 273-281.

Li D., Tapscoft T., Gonzales O., Burch P.E., Quinones M.A., Zoghbi W. A., Hill R., Bachinski L.L., Roberts R. (1999). Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. **100**,461-464.

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

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

Meier, C.F., Jr., G.M. Briggs, & Claycomb, W.C. (1986). Eletrophysiological properties of cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells. *Am. J. Physiol.* **250**, H731-H735.

Milner D. J., Taffet G. E., Wang X. , Pham T., Tamura T., Hartley C., Gerdes A.M., Capetanaki Y (1999). The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *J . Mol Cell Cardiology* **31**, 2063-2076.

Moncayo, A. (1999). Progress Towards interruption of transmission of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 Suppl 1:401-4.

Murray P., Deutscher (1990). Guide to Protein Purification. 498-521. San Diego: Academic Press ,c1990.

Nag, A.C., & Cheng, M. (1986). Biochemical evidence for cellular differentiation in adult rat cardiac muscle cells in culture: Expression of myosin isozymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 855-862.

Norris, K.A. (1998). Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigotes-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect. Immun.* **66**, 2460-5.

Ouaissi, M.A., Afchain, D., Capron, A. & Grimaud, J.A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological functions. *Nature*. **308**, 380-382.

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

Ouaissi, M.A. (1988). Role of the RGD sequence in the parasite adhesion to host cells. *Parasitol. Today*. **4**, 169-173.

Parker, H.M. & Scheneider, M.D. (1991). Growth factors, proto-oncogenes, and plasticity of the cardiac phenotype. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 179-200.

Piper, H.M., Probst, I., Schwartz, P., Hütter, J.F., & Spieckermann, P.G. (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **14**, 397-492.

Pollack, P.S., Carson, N.L., Nuss, H.B., Marino, T.A. & House, S.R. (1991). Mechanical properties of adult feline ventricular myocytes in culture. *Am. J. Physiol.* **260**, H234-H241.

Powel, T. & Twist V.W. (1976). A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle cells having respiratory control and a tolerance to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 327-333.

Rosenberg, I.A., Prioli, R.P., Mejia, J.S. & Pereira M. E. (1991). Differential expression of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase in intra- and extracellular trypomastigotes. *Infect. Immun.* **59**, 464-6.

Rosenfeld, G. (1947). Corante pancrômico para hematologia e citologia clinica. Nova combinação dos components de May Grünwald e do Giensa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantã* (1947). **20**, 329-334.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1998) Molecular Cloning: A Laboratory manual 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York USA.

Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L. & Nussenzweig, V. (1992). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J.Exp.Med.* **175**, 567-75.

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

Soeiro, M.N., Paiva, M.N., Barbosa, H.S., Meireles, M.N.S.L. & Araújo Jorge, T.C. (1999). A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *T. cruzi* invasion and is down modulated after infection. *Cell Struct. Funct.* **24**, 135-146.

Springhorn, J.P., Ellingsen, O., Berger, H.J., Kelly, R.A. & Smith, T.W. (1992). Transcriptional regulation in cardiac muscle. Coordinated expression of Id with a neonatal phenotype during development and following a hypertrophic stimulus in adult rat ventricular myocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* **267**, 14369-14345.

Velge, P., Ouaiissi, M.A., Cornette, J., Afchain, D. & Capron, A. (1988). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: role in cell-parasite interaction. *Parasitology*. **97**, 255-260.

Villalta, F., Ruiz-Ruano, A., Valentine, A.A. , Lima, M.F. (1993). Purification of a 74-Kilodalton Surface Glycoprotein from heat mioblast that inhibits binding and entry of *Trypanosoma cruzi* into heart cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **6**, 217-230.

Volz, A., Piper, H.M., Siegmund, B., Van Voohis, W.C. (1999). Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **98**, 105-116.

27/14/2
Ying-Ying Z., Shi-Qiang W. , Wei-Zhong Z., Chruscinski A., Kobilka B., Ziman B., Wang S., Lakatta E., Cheng H. , Xiao R. (2000). Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology. *Am. J. Heart Circ. Physiol.* **279**: H429- H426.

Yoshida, N. (1993). Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infect.Immun.***40**, 836-9.

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

Zingales, B., & Colli, W. (1985). *Trypanosoma cruzi* interaction with host cells in: The Biology of Trypomastigotes. Hudson L ed. Springer Vellas, Berlin, pp. 129-152.