BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
L: 19.606

De Lilian

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO DO(S) RECEPTOR(ES) DA CÉLULA HOSPEDEIRA PARA A
FAMÍLIA DE GLICOPROTEÍNAS Tc85 PRESENTE NA SUPERFÍCIE DO

Trypanosoma cruzi

MARGARET HAIGANOUGH MAGDESIAN

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA JÚLIA MANSO ALVES

SÃO PAULO

11/12/2000

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

**“Identificação do(s) Receptor(es) da Célula
Hospedeira para a Família de Glicoproteínas Tc85
Presente na Superfície do *Trypanosoma cruzi*”**

MARGARET HAIGANOUGH MAGDESIAN

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica*

Aprovada por:

Profa. Dra. MARIA JÚLIA MANSO ALVES
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. PEDRO SOARES DE ARAUJO
IQ - USP

Profa. Dra. LUCILE MARIA FLOETER WINTER
ICB - USP

Prof. Dr. SÉRGIO SCHENKMAN
UNIFESP

Profa. Dra. VILMA REGINA MARTINS
LUDWIG

SÃO PAULO
12 DE FEVEREIRO DE 2001.

À memória da minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha família do coração: Brigitte, Hans, Tim, Katharina e Stephanie pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos de nossa convivência.

Ao meu irmão Size, pelo apoio e por sempre ter estado ao meu lado.

Ao Rodrigo, por todo nosso amor e por sempre saber como colocar um sorriso em meu rosto nos momentos mais difíceis.

À Maitê por ter trazido tantas alegrias para minha vida.

Aos meus amigos e familiares, pelo apoio e pela torcida.

Ao Dr. Walter Colli e em especial à Dra. Maria Júlia Manso Alves, por me aceitarem em seu laboratório e pelos ensinamentos científicos e humanos, que foram essenciais para a minha formação.

Aos amigos do laboratório: Ricardo, Marinez, Fátima, Gustavo, Luiz, Henning, Débora, Miryam, Renata, Larissa e principalmente ao Dr. Robert Ivan Schumacher pelos protocolos, pelo apoio e pelos bons momentos de descontração.

À Marinêi por manter a ordem e cultivar, além de epimastigotas, o bom entrosamento de todos os membros do laboratório.

À Célia e ao Roberto pelo bom humor e auxílio na obtenção de quilos de tripomastigotas e toneladas de células durante todos esses anos.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO	1
ABSTRACT	2
ABREVIACÕES	3
1.INTRODUÇÃO	5
1.1. O Ciclo de Vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.2. A Patologia da Doença de Chagas	9
1.3. Interação entre o <i>T. cruzi</i> e a Célula do Hospedeiro Vertebrado	11
1.4. Ligantes de Células de Mamíferos para o <i>T. cruzi</i>	13
1.5. Ligantes de <i>T. cruzi</i> para Células de Mamíferos	15
1.6. A Família da Tc95	19
1.7. O Filamento Intermediário das Células de Mamífero	23
1.8. As Queratinas	28
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Cultivo de Células	31
3.2. Cultivo de Parasitas	32
3.3. Marcação Metabólica com ³⁵ S-metionina	33
3.4. Quantificação de Proteínas	33
3.5. Análise Eletroforética	33
3.6. Adsorção de Moléculas em Células Fixadas	35

3.7. Diálise e Concentração de Proteínas	36
3.8. Expressão de pf-Tc85-1	36
3.9. Purificação da pf-Tc85-1	37
3.10. Cromatografia de Afinidade na pf-Tc85-1	38
3.11. Western Blot	39
3.12. Obtenção de Anticorpos Monoclonais	39
3.13. Síntese de Peptídeos	40
3.14. Adesão Celular em Superfícies Recobertas com Peptídeos	41
3.15. Marcação de Peptídeos com ^{125}I -Nal	42
3.16. Ligação de Peptídeos Marcados a Células de Cultura	43
3.17. Subclonagem e Expressão de Tc85-11	43
3.18. Cromatografia de Afinidade no Peptídeo J	45
3.19. Preparação da Fração Membranar de Células	46
3.20. Ensaio de Ligação Covalente entre Peptídeos Marcados e Membranas Celulares	47
3.21. Ligação de ^{125}I -CK18 Marcada em Células de <i>T. cruzi</i>	48
3.22. Imunofluorescência	48
3.23. Invasão de Células de Cultura pelo <i>T. cruzi</i>	49
 4. RESULTADOS	 51
 4.A. RESULTADOS PRELIMINARES	 51
4.A.1. Caracterização dos Ligantes de <i>T. cruzi</i> para Células LLC-MK ₂	51
4.A.2. Caracterização dos Receptores de células LLC-MK ₂ para o <i>T. cruzi</i>	52
4.A.3. Identificação de Receptores para a Família da Tc85 em Células LLC-MK ₂	53
4.A.4. Caracterização da Molécula de 45 kDa que Liga em pf-Tc85-1	57
 4.B. IDENTIFICAÇÃO DO DOMÍNIO DA FAMÍLIA Tc85 QUE SE LIGA A CÉLULAS LLC-MK ₂	 60

4.B.1. Mapeamento do Sítio de Tc85-1 Responsável pela Adesão Celular	60
4.B.2. Afinidade do Peptídeo J por Células de Mamífero	62
4.B.3. Mapeamento dos Aminoácidos do Peptídeo J Envolvidos na Adesão Celular	64
4.B.4. Expressão de pf-Tc85-11	69
4.B.5. Importância da Região do Peptídeo J na Interação entre a pf-Tc85-11 e a Célula Hospedeira	71
4.B.6. Importância de Íons Divalentes na Adesão de Células a Família da Tc85	74
4.B.7. Interação do Peptídeo J com Moléculas de Adesão Celular	76
4.B.8. Interação entre o Peptídeo J e Elementos da Matriz Extracelular	77
 4.C. IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE CÉLULAS LLC-MK ₂ PARA O LIGANTE DA FAMÍLIA DAS TRANS-SIALIDASES	 80
4.C.1. Caracterização dos Ligantes da Célula Hospedeira para o Peptídeo J	80
4.C.2. Purificação e Identificação do Ligante de 45 kDa	83
4.C.3. Caracterização da Interação entre CK18 e o Peptídeo J	87
4.C.4. Localização de Citoqueratinas na Superfície de Células LLC-MK ₂	90
4.C.5. Efeitos da Adesão do Peptídeo J em Células LLC-MK ₂ via CK18	90
 5.DISCUSSÃO	 96
 6.CONCLUSÃO	 108
 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 109
 CURRICULUM VITAE	 134

RESUMO

Tripomastigotas, formas infectivas do *T. cruzi*, expressam em sua superfície uma família de glicoproteínas denominada Tc-85, que pertence à superfamília gênica das gp85/trans-sialidases. Nosso laboratório clonou e caracterizou um membro da família da Tc85 (Tc85-11), cuja região carboxila terminal (clone Tc85-1) adere em laminina e em células de mamíferos. O uso de peptídeos sintéticos, correspondendo em sequência à Tc85-1 possibilitou a caracterização do motivo mais conservado da superfamília gênica das gp85/trans-sialidases (VTVxNVfLYNR), que não está relacionado com a adesão a laminina, como o domínio de adesão em células de mamíferos. Por cromatografia de extratos de membrana de células LLC-MK₂ numa coluna de afinidade contendo o motivo de adesão, foi isolada uma molécula de 45 kDa identificada como citoqueratina 18 (CK18). Dados da literatura, de acordo com experimentos realizados em nosso laboratório, indicam que células epiteliais apresentam CK18 em sua superfície. Além disso, células K562, que não são infectadas pelo *T. cruzi* e não ligam ao motivo VTVxNVfLYNR nem à Tc85-1, não expõem CK18 em sua superfície. A adição de anticorpos anti-CK18 ao meio de cultura inibe a infecção de células epiteliais pelo *T. cruzi*, enquanto que a adição de pf-Tc85-11 ou VTVxNVfLYNR estimula a infecção. Esses dados sugerem que a adesão de membros da família das trans-sialidases a CK18 prepara a célula para invasão.

ABSTRACT

Trypomastigotes, which are the infective form of *Trypanosoma cruzi*, express a set of surface glycoproteins known, collectively, as Tc-85, a subset of the gp85/trans-sialidase supergene family. A member of that family, Tc85-11, has been cloned, whose carboxy-terminal fragment (Tc85-1) showed adhesive properties to laminin and cell surfaces (Giordano *et al.*, 1999). The use of synthetic peptides, corresponding to the Tc85-1 sequence, enabled us to characterize the most conserved motif of the *Trypanosoma* trans-sialidase supergene family (VTVxNVfLYNR) as the mammalian cell binding domain. Although Tc85-1 binds to laminin, this domain does not bind to laminin nor inhibits cell binding to it. Affinity chromatography experiments with LLC-MK₂ cell membrane extract enabled us to isolate the VTVxNVfLYNR motif receptor as a 45 kDa molecule that was identified as cytokeratin 18 (CK18) after trypsin digestion. This result is in agreement with published data, showing that CK18 is exposed on the outer membrane surface of epithelial cells. Furthermore, K562 cells which are not susceptible to *T. cruzi* infection, did not bind to Tc85-1 nor showed CK18 on their surface. The addition of anti-cytokeratin antibodies to the culture medium significantly inhibited the infection of epithelial cells by *T. cruzi*, while addition of fusion protein-Tc85-11 or VTVxNVFLYNR slightly stimulated the infection. These results indicate that, the binding of the trans-sialidase family members to CK18 may prepare the host-cell for parasite invasion. Furthermore, our data suggest that Tc85-11 is a multiadhesive glycoprotein, encoding at least two different binding sites, one for laminin and one for CK18 that help the parasite to overcome the barriers interposed by cell membranes, extracellular matrices and basal laminae.

ABREVIATÖES

ACN - acetonitrila

BSA – abumina sérica bovina

CK18 – citoqueratina 18

DME -- meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTT – ditiotreitól

Da – Dalton

EDAC – etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA – ácido etilenodiaminatetracético

EGTA – ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil éter)tetracético

GPI - glicosilfosfatidilinositol

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FPLC – cromatografia líquida de rápida resolução

HD - hemidesmossomos

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

HPLC – cromatografia líquida de alta resolução

IgG – Imunoglobulina G

IPTG - β -D-tiogalactopiranosídeo de isopropila

LIT – “liver infusion triptose” – meio axênico, contendo infusão de fígado e triptose

MAB – anticorpo monoclonal

OD – densidade óptica

pb – pares de bases

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

PCR – reação em cadeia da polimerase

PEG - polietilenoglicol

PMSF – fenilmetilsulfonil fluoreto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SFB – sorofetal bovino

TBS - Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM

TFA – ácido trifluoracético

TLCK – N-tosil-L-lisinaclorometilcetona

Tris – Tris-(hidroximetilaminoetano)

U – unidades enzimáticas

WGA – aglutinina de germe de trigo

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, classicamente transmitido a seres humanos e outros mamíferos por insetos da família Reduviidae, vulgarmente conhecidos como barbeiros ou chupanças (hospedeiros invertebrados do parasita). Essa doença é muito comum em regiões rurais da América Latina e segundo a Organização Mundial de Saúde existem entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas nas Américas desde o norte do México até o sul da Argentina e Chile (tabela 1). Nos centros urbanos a contaminação ocorre principalmente por transfusão de sangue ou via transplacentária. O risco de morte de uma pessoa chagásica é o dobro daquele de uma pessoa não contaminada (Brener et al., 2000).

1.1. O Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* se apresenta em três estágios de desenvolvimento, os quais podem ser morfológicamente identificáveis: amastigota, epimastigota e tripomastigota (figura 1). As formas amastigota e epimastigota são as formas reprodutivas do parasita; os tripomastigotas não se reproduzem, porém são as formas infectantes responsáveis pela passagem de um hospedeiro a outro. Sendo assim, os tripomastigotas podem ser de duas origens: os derivados de amastigotas, que se diferenciaram no interior de células do hospedeiro vertebrado e os derivados de epimastigotas, que se diferenciaram no hospedeiro invertebrado. Epimastigotas podem ser mantidos em laboratório em meio

axênico complexo. Os tripomastigotas derivados de epimastigotas do inseto ou de meio axênico são denominados tripomastigotas metacíclicos (Colli, 1993).

População exposta		População infectada	
Número	% do total da população	Número	% do total da população
<u>No Brasil</u>			
41.000.000	32%	5.000.000	4,3%
<u>Na América Latina</u>			
90.000.000		16 a 18.000.000	

TABELA 1- A Doença de Chagas no Brasil e na América Latina (Brenner et al., 2000).

A transmissão ocorre quando um inseto infectado pratica hematofagia em hospedeiros vertebrados e elimina formas infectantes, tripomastigotas metacíclicos, juntamente com fezes e urina, próximo da picada. Os tripomastigotas penetram pelo ferimento deixado, ou ainda por mucosas, e passam a infectar as células próximas à região de penetração. Dentro da célula os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que se dividem por fissão binária e finalmente se rediferenciam em tripomastigotas. Estes tripomastigotas iniciam um novo ciclo em células próximas e, eventualmente, caem na circulação do hospedeiro.

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando insetos da família Reduviidae ingerem tripomastigotas circulantes em mamíferos infectados durante a alimentação sangüínea. Ao longo do tubo digestivo do inseto, os tripomastigotas se

diferenciam em epimastigotas, que se proliferam e migram através do lúmen intestinal do inseto. Na região terminal do intestino e reto os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados com as fezes e podem infectar o vertebrado (figura 1).

O *T. cruzi* pode potencialmente invadir todos os tipos de células, exceto neutrófilos, eosinófilos e hemácias, sendo que alguns tipos de células são mais susceptíveis à infecção do que outros (Brenner et al., 2000). 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 fagocitados por células fagocitárias profissionais, porém sua destruição em fagolisossomos aborta a infecção.

FIGURA 1- O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

1.2. A Patologia da 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, parasito-dependente que surge onde o parasita se multiplica e rompe as células parasitadas e uma reação difusa que ocorre apenas no miocárdio, esôfago e cólon durante as fases aguda e crônica da infecção. Pesquisas feitas em cadáveres de pacientes portadores de miocardite chagásica crônica revelaram que o *T. cruzi* não tem preferência pelo coração, pois formas amastigotas foram observadas em diferentes células e tecidos. Por outro lado, no coração havia 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. Sendo 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 crônica. A fase aguda 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, usualmente acompanhadas por um infiltrado mononuclear, congestão aguda e edema. Estima-se que decorram entre 7 a 10 dias para que os primeiros sintomas da fase aguda se manifestem. Quando a porta de entrada é a mucosa ocular, observa-se um sinal característico, que consiste no inchaço de uma ou de ambas as pálpebras do olho infectado (sinal de Romanã; Romanã, 1935). Outra porta de entrada é a pele, sempre que haja solução de continuidade, nas mais diversas regiões, e o sinal característico, causado pelo inchaço no local da infecção, é

chamado de chagoma. O sintoma mais comum é a febre, mas podem ocorrer também inchaço de gânglios linfáticos, hepato ou esplenomegalia e edema subcutâneo. Passada a fase aguda os parasitas tornam-se raros mas, nos seus sítios de multiplicação em vários órgãos a reação focal continua.

A cardiopatia chagásica crônica constitui a forma clínica tardia da infecção e os sintomas mais característicos são a arritmia, a insuficiência cardíaca e o tromboembolismo. Nas manifestações digestivas ocorre comprometimento das funções dos órgãos afetados. A prevalência de manifestações digestiva ou cardíaca da doença depende principalmente da região endêmica, sendo que a forma digestiva ocorre com maior incidência na região Central do Brasil, sendo rara em outras áreas. Em torno de 30% dos indivíduos soropositivos desenvolvem alguma forma de expressão de doença crônica cardíaca, sendo que, em cerca de 30% desses, as manifestações clínicas serão significativas, associando-se a conspícua morbidade e mortalidade.

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 para a detecção de parasitas no sangue utilizado para transfusão de sangue 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 nível molecular a interação *T. cruzi*-célula hospedeira, na busca da compreensão dos 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, são incapazes de infectar hemácias, neutrófilos e eosinófilos e não se multiplicam neste estágio (Zingales & Colli, 1985).

1.3. Interação entre o *Trypanosoma cruzi* e a Célula do Hospedeiro Vertebrado

A adesão do parasita à célula hospedeira é suficientemente forte para resistir à pressão da corrente sanguínea *in vivo* e sucessivas lavagens de cultura de tecidos *in vitro*. Todas as formas do ciclo de vida aderem à célula hospedeira, porém o grau de adesão varia com a cepa do parasita, com a forma evolutiva e com a célula hospedeira. O fato de *T. cruzi* invadir vários e diferentes tipos de células sugere que o mecanismo de invasão utilizado é comum para todas as células do hospedeiro vertebrado, ou que múltiplos ligantes da superfície do parasita são capazes de aderir a diferentes tipos de receptores da superfície celular. Estudos com células normalmente não-fagocíticas mostraram que o processo de adesão de tripomastigotas é dependente da energia metabólica do parasita (Schenkman et al., 1991) e que a entrada de tripomastigotas ocorre preferencialmente pela região basolateral de células em cultura aderidas ao substrato. Por outro lado, a entrada de amastigotas ocorre pela região dorsal da célula (Schenkman et al., 1988), induzindo a formação de microvilosidades, onde agregados de actina podem ser visualizados (Mortara, 1991 e Procópio et al., 1999).

Apesar do amastigota estar associado a uma região rica em actina na célula do hospedeiro, citocalasina D (inibidor de polimerização de actina) não inibe a invasão por amastigotas. A entrada de tripomastigotas por sua vez, é estimulada na presença de citocalasina D, sugerindo que o mecanismo de entrada de *T. cruzi* é independente de polimerização de actina e que a desorganização do esqueleto de actina cortical facilita o processo de invasão (Tardieux et al., 1992). Além disso, diferentes estudos mostraram que os tripomastigotas preferem invadir regiões próximas às margens das células aderidas ao substrato, que são regiões de elevado dinamismo de organização e

desorganização do citoesqueleto de actina (Schenkman et al., 1988 and Heath & Holifield, 1992).

Tardieux et al. (1994) observaram que, ao aderir nessas células, os tripomastigotas, ou o extrato solúvel de tripomastigotas, promovem a mobilização de lisossomos da região perinuclear para o sítio de invasão, onde os lisossomos gradualmente se fundem com a membrana plasmática do vacúolo parasitóforo. Tratamentos que diminuem ou bloqueiam a movimentação dos lisossomos inibem a infecção, enquanto que tratamentos que induzem a movimentação aumentam a infecção. Desse modo, a desorganização do citoesqueleto celular pode facilitar a invasão de células do hospedeiro por tripomastigotas, provavelmente porque facilita a mobilização de lisossomos.

Esses eventos sugerem que a adesão do *T. cruzi* pode promover alterações importantes na célula do hospedeiro. De fato, há algum tipo de sinalização que leva à liberação de $[Ca^{2+}]_i$ tanto por parte do parasita como por parte da célula hospedeira (Vieira et al., 1994 e Moreno et al., 1994). A inibição da liberação do íon pela ação da tapsigargina (inibidor da Ca^{2+} -ATPase) diminui a infecção celular pelo parasita (Docampo et al., 1993). É interessante notar, que apenas formas tripomastigotas induzem rápidas e repetitivas elevações de $[Ca^{2+}]_i$ no interior de células hospedeiras, enquanto formas epimastigotas não causam o mesmo efeito (Tardieux et al., 1994). Burleigh & Andrews (1998) sugerem que os pulsos $[Ca^{2+}]_i$ são necessários para a fusão das membranas plasmática e lisossomal e rearranjo transitório dos microfilamentos de actina.

A molécula responsável pela liberação de $[Ca^{2+}]_i$ em células de mamíferos foi isolada de extrato de tripomastigotas e foi caracterizada como uma oligopeptidase,

denominada oligopeptidase B (Burleigh et al., 1995 & 1997). Burleigh & Andrews (1998) propõem que a oligopeptidase B atua como uma enzima processadora, que hidrolisa uma molécula precursora tripomastigota-específica, dando origem a um agonista de Ca^{2+} ativo para células de mamíferos. Embora o possível substrato da oligopeptidase B em *T. cruzi* e seu receptor na célula hospedeira ainda não tenham sido caracterizados, estudos recentes favorecem a hipótese da existência de receptores de membrana específicos na célula do hospedeiro (Leite et al., 1998).

Ming et al. (1995) demonstraram que outras via de sinalização do hospedeiro também podem ser ativadas pelo parasita. Foi observado que a invasão de células de mamíferos por tripanosomas requer ativação da cascata de sinalização de TGF- β , pois células epiteliais tornam-se mais permissivas à invasão por *T. cruzi*, quando ativadas por TGF- β . Por outro lado, células com defeito nos genes que codificam os receptores I e II para TGF- β são resistentes ao TGF- β e à invasão por *T. cruzi*. Não se sabe se a invasão celular por *T. cruzi* é feita pela ativação dos receptores de TGF- β da célula hospedeira, pelo próprio TGF- β da célula, por componentes de tripomastigotas TGF- β -símiles, ou por várias combinações desses fatores. Todavia, a presença de TGF- β em tecidos infectados aumenta a infecção (Hall & Pereira, 2000).

1.4. Ligantes de Células de Mamíferos para o *Trypanosoma cruzi*

Durante os fenômenos de reconhecimento celular, adesão e penetração, os componentes da superfície do *T. cruzi* e da célula hospedeira são de grande importância. Por parte da célula hospedeira, sugeriram-se várias espécies químicas para

intermediar esse processo, especialmente aquelas componentes da matriz extracelular. Ouaissi et al. (1984) mostraram que fibronectina é capaz de ligar-se a tripomastigotas. O possível envolvimento da fibronectina, formando uma ponte entre o parasita e a célula foi aventado e duas proteínas, uma de 85 kDa e outra minoritária de 58 kDa, foram identificadas como sendo os possíveis receptores, presentes apenas em tripomastigotas (Ouaissi et al., 1986a & 1986b). Além disso, a sequência RGD parece estar envolvida no processo, pois a pré-incubação de tripomastigotas com RGD diminui a infecção *in vivo* (Ouaissi et al., 1986b, 1988 & 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 & Pereira (1991 & 1992) também observaram a adesão de tripomastigotas em colágeno 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*. Todavia, ainda não há informação de que esta molécula tenha sido clonada.

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 super-família das trans-sialidases, descrita em detalhe no item 1.5.

Quanto à interação de tripomastigotas com células fagocíticas, Fernandez et al. (1993) observaram que anticorpos anti- β 1 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 aos 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, TGF- β e biossíntese de poliaminas. Além disso, mostraram que o receptor de vitronectina é essencial para a citoaderência de células apoptóticas, indução de prostaglandinas E2, liberação de TGF- β e atividade de ornitina descarboxilase em macrófagos. A injeção de células apoptóticas em camundongos infectados aumenta e o tratamento com inibidores da cicloxigenase reduz a parasitemia

1.5. Ligantes de *Trypanosoma cruzi* para Células de Mamíferos

Várias proteínas ou glicoproteínas da superfície do parasita também foram relacionadas com os processos de adesão e penetração. Em relação aos tripomastigotas, merece destaque um grupo heterogêneo de glicoproteínas de 60 a 250 kDa, pertencente à chamada super-família das trans-sialidases (Colli, 1993; Cross & Takle, 1993; Schenkmann et al., 1994 e Frasch, 2000). Essa enzima é expressa em altos níveis na superfície de tripomastigotas, onde se encontra ancorada por âncoras de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Trans-sialidases transferem, de modo reversível, ácido siálico $\alpha(2\rightarrow3)$ -ligados em β -galactose de sialoglicoconjugados da superfície da célula hospedeira para 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 pela trans-sialidase e formam um grupo de glicoproteínas O-glicosiladas, de 60-200 kDa, ricas em treonina,

serina e prolina (Frasch, 2000). A importância do ácido siálico em muitos fenômenos biológicos envolvendo o parasita tem sido relatada. Foi demonstrado que a presença de ácido siálico em mucinas promove a invasão celular por tripomastigotas (Schenkman et al., 1993; Franchin et al., 1997). Por outro lado, Yoshida et al. (1997) observaram que a remoção de ácido siálico de mucinas pode aumentar a infecção de células fagocíticas por tripomastigotas metacíclicos. Além disso, as mucinas ou suas âncoras de GPI podem desempenhar funções relevantes na aderência dos parasitas aos macrófagos e na produção de óxido nítrico (NO) e citocinas por estas células (De Diego et al., 1997; Camargo et al., 1997a e 1997b). Desse modo, 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.

A expressão das trans-sialidases em tripanosomas é regulada de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasita. Formas epimastigotas apresentam a enzima na forma monomérica e com baixa atividade (Chaves et al., 1993), porém, 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. Dados bioquímicos indicam que a enzima desaparece durante a transformação tripomastigota-amastigota no interior da célula hospedeira, reaparecendo novamente quando novos tripomastigotas são formados, ainda no interior da célula do hospedeiro (Frevert et al., 1992; Rosenberg et al., 1991 e Abuin et al., 2000). No entanto, estudos imunocitoquímicos mostram a presença da proteína na forma amastigota (Souto-Padron et al., 1990; Frevert et al., 1992 e Rosenberg et al., 1991). Os

tripomastigotas liberam quantidades significantes de trans-sialidase no citosol de células infectadas. A trans-sialidase continua sendo expressa pelo tripomastigota no ambiente extracelular e constantemente liberada no meio de cultura (Colli, 1993; Rosenberg et al., 1991 e Schenkman et al., 1992).

A super-família gênica das trans-sialidases contém de 140 a 1.000 membros, com diferentes graus de similaridade entre si. Diversas formas de classificação dos membros da família das trans-sialidases foram propostas, dependendo do grau de identidade entre as seqüências, massa molecular e outras características (Colli et al., 1993; Cross & Takle, 1993; Schenkman et al., 1994 e Frasch, 2000). Por outro lado, o número de novos genes sendo identificados pelo projeto genoma de *T. cruzi* continua crescendo e uma classificação permanente ainda não foi descrita.

Frasch (2000) sugere que os membros da família possam ser classificados em duas sub-famílias, a das trans-sialidases (140 genes) e a das trans-sialidases-símile (com mais de 700 genes). 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 (figura 2). Dois desses 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 N-terminal que contém o sítio catalítico e a C-terminal que contém repetições em série de 12 amino ácidos (repetições SAPA). Os membros desses dois grupos diferem essencialmente na região N-terminal. O grupo das TS tem atividade enzimática, ausente no grupo TS I, em virtude de uma única mutação de tirosina na posição 342 para histidina (Cremona et al., 1995). É interessante notar que, membros do grupo sem atividade enzimática, ligam β -galactose com a mesma especificidade da trans-sialidase ativa (Cremona et al., 1999). Membros do terceiro grupo TS-e são expressos por

epimastigotas, têm baixa atividade enzimática, porém não são liberados em 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 as 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).

Diversos genes similares àqueles codificados pelas trans-sialidases, mas cujos produtos não têm atividade enzimática foram identificados e incluídos na super-família das trans-sialidases. Frasch (2000) os classifica na família de genes trans-sialidase-símile. Os produtos desses genes apresentam similaridade (30-40%) com as seqüências de amino-ácidos 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, que é característico de todos os membros da família das trans-sialidases e trans-sialidase-símile, porém sem função conhecida (Colli, 1993 e Cross & Takle, 1993).

Diferentes grupos vêm estudando as possíveis funções de membros da super-família das trans-sialidases, além da atividade enzimática. Membros dessa família podem participar da fuga do vacúolo após a invasão de células de mamíferos (Burleigh & Andrews, 1995); inibir a ativação das vias alternativas e clássica complemento, ao ligar-se em C3b e C4b, evitando assim a formação da C3 convertase ativa (Norris, 1998) e aderir em componentes da matriz extracelular (Alves et al., 1986; Abuin et al., 1989; Ouaisi et al., 1986; Lima & 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).

FIGURA 2- Apresentação esquemática da estrutura primária dos membros da família das trans-sialidases. Membros da família das trans-sialidases podem conter de zero a quatro cópias das repetições SxDxGxTW. As repetições C-terminal também podem ou não estar presentes e variam em quantidade em diferentes membros da família. O motivo VTVxNVfLYNR é comum a todos os membros da família.

1.6. A Família da Tc85

Em nosso laboratório uma família de glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* de 85 kDa (Tc85), que se liga à lectina WGA (wheat germ agglutinin), foi isolada de lisado de tripomastigotas, não sendo encontrada nos outros estágios de desenvolvimento do parasita (Katzin & Colli, 1983). Observou-se que um anticorpo monoclonal contra esta glicoproteína, mAb 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 mAb 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 o mAb 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).

Por análise em gel bidimensional, verifica-se que a Tc85 é uma família heterogênea de glicoproteínas, que se diferenciam por diferentes pIs (pI 5,5-9,0). Demonstrou-se que componentes acídicos desta família (pI 5,6-6,7) reconhecem moléculas de laminina (LBG-laminin binding glycoproteins) sem a participação de carboidratos tanto do ligante como do receptor (Giordano et al., 1994). Previamente, já fora descrita a ligação de glicoproteínas de 85 e 58/68 kDa de tripomastigotas em fibronectina, provavelmente envolvendo a sequência RGD da fibronectina (Ouaisi, 1988). Existem porém, várias diferenças entre essas duas proteínas de 85 kDa (pI, número de moléculas na superfície do parasita, etc.), levantando a interessante hipótese de que possam ser membros diferentes da mesma família da Tc85 (Giordano et al., 1994).

A clonagem e caracterização de um membro dessa família, Tc85-11, revelou alta similaridade entre a sua sequência e a de membros da super-família gênica das trans-sialidases (figura 3) (Giordano et al., 1999). O epitopo do mAb H1A10 foi caracterizado e a proteína recombinante codificada pelo clone Tc85-11 liga-se *in vitro* em laminina e em células de mamíferos (Giordano et al., 1999). Neste trabalho vamos nos referir à família da Tc85, pois, originalmente, essas moléculas foram descritas por

nosso laboratório. O leitor deve, entretanto, ter em mente de que essa família pertence a uma família maior, ou seja, a da trans-sialidase. A partir desses dados, pode ser levantada a hipótese de que cada membro da família das trans-sialidases pode interagir com mais de um ligante. Embora os membros dessa família apresentem similaridades de sequência em graus variáveis, pequenas diferenças entre elas podem ser responsáveis por diferentes especificidades permitindo a interação de diferentes membros com diferentes ligantes do hospedeiro vertebrado. Sendo assim, é nossa hipótese que a família das trans-sialidases codificaria moléculas de adesão para permitir ao parasita transpor a matriz extracelular e a membrana plasmática e alcançar o ambiente intracelular.

Para testar essa hipótese e tentar caracterizar os possíveis receptores da Tc85-11 no hospedeiro vertebrado, clivou-se essa molécula em duas e a região carboxila terminal, que se liga a laminina, a células de mamífero e contém o epítipo do anticorpo mAb H1A10 (Giordano et al., 1999) foi dividida em peptídeos menores (figura 3). O uso de peptídeos na identificação e caracterização de receptores vem sendo amplamente utilizado na literatura (Pasqualini et al., 1996; Nomizu et al., 1999) e a fragmentação da Tc85-11 em peptídeos foi a ferramenta utilizada nessa tese para analisar a função de cada fragmento da Tc85-11 e seus respectivos receptores em células de mamíferos durante o processo de invasão.

FIGURA 3- Representação esquemática de um membro da família da Tc85 presente na superfície de tripomastigotas, contendo motivos conservados da família das trans-sialidases. O clone Tc85-11 representa a sequência completa, Tc85-12 representa a sequência completa sem regiões amino e carboxila-terminal hidrofóbicas e Tc85-1 a região carboxila terminal, que foi dividida em 11 peptídeos sintéticos (A-K) para a caracterização de ligantes da célula hospedeira para família da Tc85.

1.7. O filamento Intermediário das Células de Mamíferos

Este trabalho pretende demonstrar a participação de moléculas do filamento intermediário, particularmente citoqueratinas de células LLC-MK₂, no processo de interação parasita-célula hospedeira. Por esse motivo, procedemos a uma revisão desses componentes do citoesqueleto.

O citoesqueleto das células de eucariotos superiores apresenta estruturas em rede que conectam os diferentes componentes do meio intracelular, sendo essas estruturas formadas por filamentos de três diferentes tipos. Os filamentos de 7 a 9 nm de diâmetro são constituídos por polímeros de actina e são denominados microfilamentos; os de 24 nm de diâmetro são constituídos por polímeros de tubulina e são denominados microtúbulos; os filamentos de 10 nm de diâmetro são denominados filamentos intermediários e podem ser formados por homo ou heteropolímeros de diferentes moléculas, dependendo do tipo de célula e estágio de diferenciação em um mesmo organismo, como citoqueratina e vimentina (figura 4) (Steinert & Roop, 1988).

Os filamentos intermediários são extremamente estáveis e formam os principais componentes de tecidos mortos, são altamente insolúveis e sua polimerização não necessita de energia. Os peptídeos que compõem as fibras do filamento intermediário podem ser glicosilados e fosforilados e a organização e desorganização das fibras durante o ciclo celular pode ser regulada por um dinâmico mecanismo de fosforilação, que pode ou não ser modulado por moléculas associadas ao filamento intermediário (Steinert & Roop, 1988 e Omary et al., 1998).

FIGURA 4- Filamentos que compõem o citoesqueleto celular.

Os mais de 50 genes que codificam os polipeptídeos que formam os filamentos intermediários podem ser agrupados em seis grupos. Essas moléculas variam em massa molecular de 40 a 125 kDa, mas apresentam diversas similaridades bioquímicas, imunológicas e estruturais entre si (Fuchs & Weber, 1994). Os genes de filamentos intermediários dos tipos I e II codificam um grupo de mais de 30 citoqueratinas comumente encontradas em células epiteliais. O tipo III inclui vimentinas (encontradas em células de origem mesenquimal), desminas (expressas em músculos), proteínas acídicas fibrilares da glia (em células da glia) e periferinas (no sistema nervoso periférico). Os genes de filamento intermediário do tipo IV são expressos em neurônios e codificam proteínas como a α -internexina e o triplete de proteínas do neurofilamento NF-L, NF-M e NF-H. Laminas são caracterizadas como grupo V e são os constituintes primários da lâmina fibrosa situada na superfície interna da membrana nuclear. O grupo VI é composto por moléculas do filamento intermediário recentemente descobertas, tais como nestina e sinemina, porém, dependendo do critério de classificação adotado, essas

moléculas podem ser incluídas em grupos anteriormente descritos (Fuchs & Weber, 1994; Steinert & Roop, 1988 e Coulombe et al., 2000).

Diferentemente de actinas e tubulinas, que são altamente conservadas ao longo da evolução, a identidade de sequência entre as proteínas do filamento intermediário pode variar de 50-99%, em filamentos do mesmo tipo, até apenas 25% entre filamentos de tipos diferentes. Todavia, as proteínas componentes dos filamentos intermediários conservam uma estrutura secundária comum, todas apresentam um domínio α -hélice central, flanqueado por terminações não-hélice amino e carboxila (figura 5). Ao longo de toda a α -hélice há repetições de aminoácidos hidrofóbicos, de modo que são apolares todo primeiro e quarto resíduo de cada sete aminoácidos. Essa sequência permite uma exposição de resíduos hidrofóbicos na superfície da hélice que favorece a formação de uma superhélice entre duas moléculas do filamento intermediário (Fuchs & Weber, 1994).

A α -hélice central é dividida por três pequenos segmentos não-hélice, denominados L1, L1-2 e L2, que frequentemente contêm prolina ou múltiplos resíduos de glicina. Desse modo, as divisões da α -hélice central podem ser denominadas hélices 1A, 1B, 2A e 2B. O tamanho das α -hélices pode variar entre 281-356 aminoácidos em comprimento e a identidade entre as sequências é altamente conservada no início da hélice 1A e final da hélice 2B, sendo essas regiões o principal diagnóstico para proteínas do filamento intermediário. Além disso, foi observada a distribuição de aminoácidos básicos e ácidos em intervalos constantes ao longo da molécula, ocorrendo 3 vezes entre cada 28 resíduos. Tais características favorecem a organização dessas proteínas em polímeros que compõem o filamento intermediário.

Embora suas seqüências não sejam conservadas e não tenham estrutura em α -hélice, as regiões amino e carboxila terminal das moléculas do filamento intermediário também podem influenciar na formação de filamentos. Contudo, a definição de suas funções ainda é motivo de controvérsia e parece variar de acordo com o tipo de proteína envolvida (Fuchs & Weber, 1994 e Coulombe et al., 2000). Os domínios amino e carboxila terminal variam muito em tamanho e composição de aminoácidos. A região carboxila terminal pode apresentar 9 aminoácidos em citoqueratina 19 e 1.491 aminoácidos em nestina, sugerindo que essas regiões podem apresentar diferentes funções em diferentes moléculas dos filamentos intermediários.

FIGURA 5- Esquema da estrutura das proteínas componentes do filamento intermediário.

A principal função atribuída aos componentes do filamento intermediário, pelo menos em vertebrados, é a de proporcionar aos tecidos proteção contra o “stress” mecânico. Células epiteliais, musculares e astrócitos sem uma rede de filamento intermediário intacta estão mais sujeitas ao rompimento, como demonstrado por

Takahashi et al (1999) em experimentos com camundongos mutantes, que não expressam genes específicos do filamento intermediário. Fuchs & Cleveland (1998) observaram o mesmo fenômeno em estudos com pacientes que apresentam mutações em seqüências de tipos específicos de filamento intermediário. Além da organização estrutural, o filamento intermediário também preenche funções específicas do tipo celular, como a contribuição de neurofilamentos no crescimento radial de axônios (Lee et al., 1996), de vimentina na síntese de esfingolipídeos (Gillard et al., 1998) e de filamentos de K8-K18 na proteção dos hepatócitos contra apoptose induzida por drogas (Ku et al., 1997 e Caulin et al., 2000).

A organização espacial do filamento intermediário no citoesqueleto é a maior determinante de suas funções na célula (Alberts et al., 1994). Essa organização é determinada por moléculas que não fazem parte do filamento intermediário, mas que se associam aos seus filamentos e formam conexões com outros elementos do citoesqueleto. Por outro lado, seqüências específicas, localizadas nos próprios componentes do filamento intermediário, influenciam tanto a distribuição dos filamentos no citoplasma quanto as interações das moléculas do filamento intermediário entre si (Coulombe et al., 2000).

A rede formada pelo filamento intermediário possibilita a interação entre domínios específicos da membrana plasmática e da membrana nuclear. Cada linhagem celular é caracterizada por um tipo particular de evolução e de expressão de determinada molécula do filamento intermediário. Essa relação entre cada molécula do filamento intermediário e seu tecido de expressão específico foi vastamente explorada como ferramenta de diagnóstico na identificação da origem celular em patologia de câncer (Osborn et al., 1985). O epitélio expressa filamentos do tipo I e II, coletivamente

chamados de queratinas, e o padrão de expressão de queratinas também difere de acordo com o tipo de epitélio. Citoqueratinas 1 e 10 são encontradas exclusivamente no epitélio estratificado da epiderme, enquanto citoqueratinas 8 e 18 são encontradas tipicamente no epitélio simples que compõe os hepatócitos do fígado. Mesmo entre tipos iguais de epitélio, o padrão de queratinas pode mudar durante a diferenciação celular, como é o caso da epiderme, onde as células basais expressam citoqueratinas 5 e 14 porém as camadas supra basais, derivadas da camada basal, expressa citoqueratinas 1 e 10.

A alteração do tipo de proteína do filamento intermediário expressa durante o desenvolvimento e diferenciação celular também pode ser freqüentemente observada e parece coincidir com eventos principais do desenvolvimento. Por exemplo, os filamentos de queratina são o único tipo de filamentos expresso no embrião inicial e no embrião pré-implantado (Jackson et al., 1980), porém ao se desenvolverem as primeiras células mesenquimais, derivadas da ectoderma, inicia a expressão de filamentos intermediários do tipo III (vimentina). Essas observações sugerem funções distintas para diferentes moléculas do filamento intermediário.

1.8. As Queratinas

O maior e mais complexo grupo de proteínas do filamento intermediário são as queratinas. Existem pelo menos 30 queratinas que variam em massa molecular de 40 a 67 kDa e estão divididas em dois grupos (Moll et al., 1982). As queratinas do tipo II são básicas ($pK_i = 6-8$) e incluem 8 proteínas epiteliais, K1-K8 e quatro queratinas de

cabelo, Hb1-Hb4. Queratinas do tipo I são mais ácidas ($pK_i = 4-6$) e incluem 11 queratinas epiteliais, K9-K20 e quatro queratinas de cabelo Ha1-Ha4.

As queratinas se organizam *in vitro* como heteropolímeros obrigatórios numa razão equimolar, formando combinações de pelo menos uma queratina do tipo I e uma queratina do tipo II. Os outros tipos de filamentos intermediários não apresentam essa característica, formando copolímeros apenas quando dois ou mais tipos estão presentes na mesma célula. Os pares de queratinas dos tipos I e II são expressos diferentemente na maioria dos epitélios. Os filamentos gerados por diferentes heteropolímeros de queratina têm propriedades físicas distintas, sugerindo que a expressão de um par específico de queratinas *in vivo* pode adequar as fibras do filamento intermediário às necessidades do tecido. As queratinas epidérmicas formam a estrutura mais estável da natureza e nos vertebrados estão distribuídas pelo corpo nas regiões mais sujeitas ao “stress” físico e ambiental.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

- Determinar o sítio da família da Tc85 responsável pela adesão em células de mamífero.
- Identificar ligantes em células de mamíferos para a família da Tc85.
- Determinar os efeitos da interação entre membros da família da Tc85 e células de mamífero.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo de Células

As células LLC-MK₂ (epiteliais de rim de macaco Rhesus) foram mantidas e subcultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado com 1,2 g/L de NaHCO₃, 5 x 10⁵ 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 das células foram realizados a partir de monocamadas confluentes. As monocamadas celulares foram lavadas com 10 mM de tampão fosfato/150 mM de NaCl (PBS) e posteriormente digeridas com 0,1% de tripsina em PBS contendo 1 mM de EDTA. As culturas foram iniciadas com aproximadamente 3 x 10⁴ células/cm² em garrafas de plástico de 75 cm² de área. Os subcultivos foram feitos a cada sete dias, quando as monocamadas se apresentavam novamente confluentes.

3.2. Cultivo de Parasitas

Neste estudo foi utilizado *T. cruzi* de cepa Y, isolado de um caso agudo humano de Doença de Chagas (Silva & Nussenzweig, 1953). Após o inóculo inicial de 2 x 10⁷ parasitas/ml em meio LIT, o cultivo foi mantido até a fase estacionária de crescimento (aproximadamente 3 dias) sob agitação a 120 rpm e 28°C. Nessas condições são obtidas apenas formas epimastigotas.

Para iniciar a produção de tripomastigotas de cepa Y, o sangue periférico de camundongos na fase aguda de infecção (sétimo dia após o inóculo intraperitoneal de 4000 tripomastigotas) foi retirado assépticamente na presença de 3,8% de citrato de sódio e centrifugado a 450 x g por 10 minutos a 4°C. Devido à motilidade do parasita, ao final de 1 hora de incubação a 37°C, os tripomastigotas encontram-se no plasma. O sobrenadante foi então adicionado às monocamadas confluentes de células LLC-MK₂ em meio DME suplementado com 2% SFB. Em média, cada monocamada de 36 cm² foi infectada com 1 x 10⁶ tripomastigotas. Após 48 horas o meio foi retirado e substituído por meio DME/2%SFB. A partir do quinto dia ocorre a liberação de tripomastigotas no meio. Esses parasitas foram coletados, contados e 1 x 10⁷ parasitas foram utilizados para se infectar monocamadas de células LLC-MK₂ de 36 cm². O cultivo de células e de tripomastigotas foi mantido por R. Zangrandi.

A suspensão de parasitas obtida por esse sistema pode apresentar, além de tripomastigotas, fragmentos de células LLC-MK₂ e certa proporção de amastigotas e formas intermediárias. Quando necessário, os tripomastigotas foram enriquecidos por centrifugação (1.000 x g, 10 minutos) e incubados a 37°C por 1 hora. O sobrenadante contendo as formas tripomastigotas foi adicionado sobre o mesmo volume de lymphoprep (Nycomed), uma solução inerte mais densa que os parasitas, e centrifugado a 8.000 x g, 15 minutos. Desse modo, os debris celulares são precipitados e os parasitas ficam na interfase lymphoprep-meio DME. Esses tripomastigotas foram coletados, contados e utilizados nos experimentos subsequentes.

3.3. Marcação Metabólica com ^{35}S -metionina

As células foram incubadas com meio sem metionina contendo 2 % de SFB por 30 minutos a 37° C. Após este tempo, foram adicionados 150 μCi de ^{35}S -metionina/6 x 10^6 células e a mistura foi incubada por mais 4 horas a 37° C. As células foram lavadas e extraídas com 1 mL de PBS contendo detergente (NP-40 1% ou n-octil- β -D-glicopiranosídeo 100 mM), 1 mM PMSF, 1 mM TLCK e 2,8 $\mu\text{g/mL}$ de aprotinina. A suspensão foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi incubado com células fixadas.

3.4. Quantificação de Proteínas

O doseamento de proteínas foi feito em duplicata pelo método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976), utilizando-se albumina bovina como padrão.

3.5. Análise Eletroforética

3.5.1. Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE): o método utilizado foi descrito por Laemmli, 1970. A separação de proteínas foi feita em gel de 9% de poliacrilamida com dimensões de 9 x 5,5 x 0,75 cm, e o gel de empilhamento foi preparado na concentração de 3% acrilamida. Esse material foi submetido à amperagem constante de 30 mA até que o corante marcador (azul de bromofenol) atingisse 0,25 cm da extremidade inferior do gel. Em seguida o gel foi corado e fixado em solução aquosa

contendo metanol 45%, ácido acético 10% e azul de Coomassie 0,2% por 1 hora. Para descoloração, o gel foi lavado várias vezes por 30 minutos com uma solução aquosa contendo etanol 20% e ácido acético 7%. A quantidade de amostra aplicada em cada canaleta do gel foi de aproximadamente 15 µg de proteínas para misturas e 3 µg para proteína purificada. Quando as amostras estavam radioativamente marcadas, aplicou-se amostras contendo 50.000 cpm por canaleta.

3.5.2. Eletroforese Bidimensional: o método utilizado foi descrito por O'Farrel (1975). Para a focalização isoeletrica foram preparados géis cilíndricos em capilares de 1 mm que compõem o aparelho Mini 2D Electrophoresis Cell (Bio-Rad) contendo acrilamida 3,8%, NP-40 2%, uréia 9,5 M e anfolitos 2%. Após a pré-corrida desses géis (300 V por 20 minutos e 400 V por 40 minutos), as amostras foram colocadas no topo do gel e a corrida efetuada a 400 V por 4 horas. Esses géis foram removidos dos capilares, colocados no sentido horizontal sobre géis de SDS-PAGE 9% de 1 mm de espessura e submetidos à corrente elétrica de 30 mA, como indicado no item 3.5.

3.5.3. Secagem e Radiografia: após a descoloração, o gel foi lavado com água bidestilada por 15 minutos e seco em papel de filtro sob vácuo a 60°C. Em seguida os géis foram cobertos com filmes para raios-X (KodaK), utilizando-se ou não intensificadores e guardados a -70°C por um período variável, de acordo com a quantidade de radioatividade de cada gel.

3.5.4. Eletroeluição: foi feita separação por SDS-PAGE da mesma amostra em canaletas diferentes, sendo que, uma das canaletas foi corada com azul de coomassie e utilizada como guia para se cortar o fragmento de interesse não corado na canaleta adjacente. Esse fragmento de gel foi colocado num aparelho para eletroeluição modelo 422 Electro Eluter (Bio-Rad) segundo as recomendações do fabricante. O material

eletroeluído foi coletado em 200 μ L, concentrado 20 vezes (item 3.7) e novamente submetido à separação por SDS-PAGE.

3.6. Adsorção de Moléculas em Células Fixadas

Um total de 6×10^6 células LLC-MK₂, 1×10^9 formas tripomastigotas ou epimastigotas de *T.cruzi* de cepa Y foram fixados ao serem incubados com 0,25 % glutaraldeído em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas mais 3 vezes com PBS e incubadas nas mesmas condições com PBS/3 % BSA. As células fixadas, e com sítios não específicos bloqueados, foram lavadas 3 vezes com PBS e incubados com agitação a 4°C por 18 horas com extrato de células. O extrato de células foi preparado com 3×10^6 células LLC-MK₂, 1×10^9 formas tripomastigotas ou epimastigotas, metabolicamente marcadas com ³⁵S-metionina (item 3.3), lavadas 2 vezes com PBS e lisadas com 1 mL de PBS contendo 100 mM n-octil- β -D-glicopiranosídeo, PMSF 1 mM, TLCK 1 mM e aprotinina 2,8 μ g/mL.

Após a incubação, as células fixadas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas sob agitação com NaCl 1 M por 1 hora à temperatura ambiente. O eluato foi recolhido e as células foram lavadas mais 3 vezes com PBS, para serem incubadas nas mesmas condições anteriores com uréia 8 M por 1 hora, sendo o eluato novamente recolhido. Esse material foi dialisado antes de ser analisado por SDS-PAGE.

3.7. Diálise e Concentração de Proteínas

Quando necessário, frações eluídas de colunas de afinidade com alta concentração iônica foram dialisadas. Desse modo, foram removidas as tampas dos tubos de 1,5 mL que continham as frações e em seu lugar foram aderidas membranas de diálise permissivas a moléculas menores que 5.000 Da. As membranas foram colocadas em contato com 2 L de água bidestilada a 4°C, sendo que, essa água foi trocada por 5 vezes a cada 2 horas.

Para concentrar as amostras, o material foi congelado por 15 minutos em gelo seco e submetido ao secamento a vacuo (Speed Vac).

3.8. Expressão de pf-Tc85-1

A molécula de DNA contendo a fração correspondente a Tc85-1 foi ligada em vetor pTrcHis (Giordano et al., 1999). Para expressão desse clone, aproximadamente 1 ng de plasmídeo diluído em água foi utilizado para se transformar bactérias *E. coli* da linhagem TOP10. A transformação foi semeada em placas contendo meio sólido LB com 50 µg/mL de ampicilina e incubada a 37°C por 18 hs. As colônias resultantes foram utilizadas para se inocular 3 mL de meio LB líquido com ampicilina. Após a incubação a 37°C por 1 hora com agitação constante (250 rpm), esse inóculo foi adicionado a 100 ml de meio LB líquido com ampicilina. As bactérias foram incubadas nas mesmas condições anteriores até que a OD₆₀₀ atingisse 0,75. Neste ponto foi retirado 1 ml da cultura para ser utilizado como controle não induzido, enquanto que ao

restante da cultura foi adicionado de 0,1-0,4 mM de IPTG. Manteve-se a incubação por mais três horas, a 200 rpm e 37°C.

Ao final das 3 horas, a cultura foi resfriada em gelo e centrifugada a 5.000 x g, obtendo-se um precipitado de células que foi lavado com 0,25 volumes de uma solução contendo Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e EDTA 2 mM. O precipitado de bactérias foi guardado a -20°C até que seu conteúdo fosse analisado por SDS-PAGE e/ou Western blot.

3.9. Purificação da pf-Tc85-1

3.9.1. Cromatografia de Afinidade: a expressão de proteínas em pTrcHis ocorre com a adição de 6 a 10 resíduos de histidina na porção C-terminal da proteína recombinante. Estas histidinas têm afinidade por cátions divalentes imobilizados em uma coluna de quelantes. Sendo assim, a purificação foi realizada da seguinte forma: após a indução e expressão da proteína recombinante por 3 horas, as células foram precipitadas a 5.000 x g por 10 minutos. Após serem ressuspensas em 0,1 volume de tampão A (tampão fosfato 10 mM pH 7,8, NaCl 0,5 M e uréia 8 M), a suspensão foi submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento por 10 minutos em gelo seco e 10 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram rompidas num sonicador e a mistura foi centrifugada a 20.000 x g por 25 minutos. O sobrenadante foi incubado com uma coluna de Níquel (Ni-NTA Superflow/Qiagen) por 1 hora à temperatura ambiente com agitação constante.

A coluna foi lavada com 3 volumes de tampão A, 3 volumes de tampão de lavagem (idem ao tampão A, porém com pH 6,0) e a eluição foi feita com tampão de

eluição (idem ao tampão A, porém com pH 4,0). As alíquotas foram recolhidas em 0,1 volume de Tris-Cl 1M, pH 8,0 e seu conteúdo foi analisado por SDS-PAGE e por Western-blot com o mAbH1A10 e T7.Tag (Invitrogen), que reconhece a cauda amino-terminal de histidinas. Foram obtidos aproximadamente 5 mg de proteína de fusão purificada a cada 1 L de cultura de *E.coli*.

3.9.2. Cromatografia de Gel Filtração: a pf-Tc85-1 purificada em coluna de Níquel foi dialisada em tampão fosfato 10 mM pH 7,2 e concentrada para 1 mg/mL. Esse material foi injetado num aparelho de FPLC para purificação numa coluna de gel filtração (Superose 12-Pharmacia). A pf-Tc85-1 foi eluída com o mesmo tampão e as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE.

3.10. Cromatografia de Afinidade na pf-Tc85-1

A pf-Tc85-1 purificada foi ligada à Sepharose ativada com brometo de cianogênio (Pharmacia), segundo o protocolo do fabricante. Esta coluna foi incubada com extratos de células LLC-MK₂ por 18 horas a 4° C em tampão PBS sob agitação. A coluna foi então lavada com 40 volumes de PBS/NP-40 0,05 % e incubada com NaCl 1 M por 1 hora à temperatura ambiente. O eluato foi recolhido e a coluna foi lavada com mais 40 volumes de PBS pH/NP-40 0,05 %, para ser incubada com uréia 8 M por 1 hora nas mesmas condições. O eluato foi recolhido e assim como o eluato de NaCl 1 M foi dialisado e teve o seu conteúdo analisado por dosagem da radioatividade, seguido de separação por SDS-PAGE e exposição a filmes de raio X.

3.11. Western Blot

Após separação por SDS-PAGE, os géis foram colocados sobre membranas de nitrocelulose e encaixados num suporte que compõe o aparelho Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad). O suporte contendo o gel foi submergido numa solução aquosa contendo Tris-base 25 mM (pH 8,3), glicina 150 mM e metanol 20%. Com o lado contendo a membrana voltado para o catodo e o lado do gel voltado para o anodo, esse sistema foi submetido à diferença de potencial de 20 V por 16 horas. Após esse período, a membrana de nitrocelulose, contendo as proteínas foi removida e corada com uma solução contendo Ponceau 0,2% e ácido acético 1% em água. Essa membrana foi lavada com TBS (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) e incubada com tampão de bloqueio contendo PBS/BSA 3% por 2 horas, seguido por 18 horas de incubação a 4°C com o anticorpo de interesse. A membrana foi lavada com TBSTT (TBS contendo Tween 0,05%, 20 e Triton 0,03%) e incubada por mais 2 horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase em solução bloqueadora (TBS/BSA 3%) à temperatura ambiente. Essa membrana foi lavada e a marcação foi revelada com o kit ECL (Amersham). Após a utilização, a membrana pode ser re-utilizada, depois de incubada com 100 mM 2-β-mercaptoetanol, 2 % SDS e 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7, a 50° C por 30 minutos e lavada com TBSTT 2 vezes por 10 minutos.

3.12. Obtenção de Anticorpos Monoclonais

A produção de anticorpos monoclonais anti molécula de 45 kDa foi realizada segundo Alves *et al.*, 1986.

3.13. Síntese de Peptídeos

Peptídeos cuja sequência se sobrepõe ao clone da pf-Tc85-1 foram sintetizados pelo grupo da Dra. Maria Aparecida Juliano e Dr. Luiz Juliano na UNIFESP. A síntese foi feita num sintetizador de mesa automático de fase sólida (PSSM 8 system - Shimadzu), usando-se síntese de fase sólida pelo método Fmoc. Os peptídeos finais desprotegidos foram purificados por HPLC semi-preparativo em uma coluna Econosil C-18 (10 μ m, 22.5 x 250 mm) e sistema de dois solventes: (A) ácido trifluoroacético (TFA)/H₂O (1:1000) e (B) TFA/ ACN /H₂O (1:900:100). A coluna foi eluída num fluxo de 5 mL/min com gradientes de 10 (ou 30) a 50 (ou 60)% do solvente B por 30 ou 45 minutos. Foram realizados ensaios de HPLC analítico com um sistema binário de HPLC (Shimadzu) com um detector UV-vis SPD-10AV (Shimadzu) e um detector fluorescente RF-535 (Shimadzu), acoplado a uma coluna Ultrasphere C-18 column (5 μ , 4.6 x 150 mm), que foi eluída com os solventes A1 (H₃PO₄/H₂O, 1:1000) e B1 (ACN / H₂O/H₃PO₄, 900:100:1) sob um fluxo de 1.7 mL/min e um gradiente de 10-80% de B1 por 15 min. Os eluatos da coluna de HPLC foram monitorados por absorvância a 220 nm e por emissão de fluorescência a 420 nm seguida por excitação a 320 nm. A pureza dos peptídeos foi checada por MALDI-TOF no modo reflectron (TofSpec-E from Micromass Manchester, U.K.) e por sequenciamento de aminoácidos, quando necessário, feito com um sequenciador Shimadzu modelo PPSQ-23 (Grant, 1992).

3.14. Adesão Celular em Superfícies Recobertas com Peptídeos

Numa placa de 24 poços, 30 μg de cada peptídeo em 200 μl de DMSO 10% (em H_2O) foram secos durante a noite a 37°C com agitação, lavados 1 vez com PBS e os poços bloqueados com PBS/1% BSA durante 2 horas. Uma garrafa média de células LLC-MK₂ (ou de outra linhagem) foi tripsinizada (2 mL) até todas as células se soltarem, sendo então ressuspensas com 5 ml de meio para cultura DME/10% SFB e incubadas para recuperação a 37°C em estufa de cultura por 40 minutos. Após adicionar mais 25 ml de meio DME sem soro, as células foram coletadas por centrifugação a 800 x g por 5 minutos e lavadas com mais 25 ml de meio DME para garantir a extração do soro fetal. 1×10^5 células em 0,5 ml de DME foram adicionados aos poços contendo os peptídeos de interesse e incubados por 1 hora a 37°C em estufa de cultura. Após esse tempo as células não aderidas são removidas lavando-se os poços por 3 vezes com DME sem soro e observadas em microscópio invertido. Como controle positivo as células foram incubadas em poços sem peptídeos na presença de DME 10% soro fetal bovino e como controle negativo foram utilizados poços recobertos com 30 μg de albumina. Ensaios de inibição foram feitos por pré-incubação das células com os possíveis inibidores (peptídeos, anticorpos, EDTA e EGTA) à temperatura ambiente por 15 minutos.

Os anticorpos utilizados para inibir a adesão de células LLC-MK₂ em poços recobertos com o peptídeo J, foram: Anti-LL (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$): anticorpo policlonal anti-células LLC-MK₂; anti-pf-Tc85-1 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$): anticorpo policlonal anti pf-Tc85-1; anti- $\beta 1$ (1:20) e anti- $\beta 2$ (1:80)-Gibco: anticorpos anti as cadeias $\beta 1$ e $\beta 2$ de integrinas; anti-

$\alpha 4$ (50 $\mu\text{g/ml}$) e anti- $\alpha 5$ (1:20)-Gibco: anticorpos anti as cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$ de integrinas; anti-fibronectina (20 $\mu\text{g/ml}$)-Boehringer: inibe a adesão de fibronectina às células; anti-CD-47 (1:20)-Pharmingen: reconhece uma glicoproteína de 55-66 kDa. Os anticorpos comerciais foram utilizados nas concentrações recomendadas pelos fabricantes.

Para quantificar as células aderidas, após o procedimento anterior, foram adicionados 200 μL de solução de cristal violeta 0,2%, contendo metanol 20% em H_2O , seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Os poços foram lavados por 3 vezes com PBS, e foram adicionados 200 μL de SDS 1% em H_2O com incubação de 10 minutos à temperatura ambiente. Ao material de cada poço coletado foram adicionados 800 μL de água e a OD_{600} foi determinada. A variação de absorbância entre as triplicatas foi da ordem de 1% a 30%. Esta técnica apresentou-se bastante sensível e os valores apresentados nas tabelas e gráficos foram corrigidos segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ de adesão celular} = \frac{(\text{Abs}_{600} \text{ da amostra} - \text{Abs}_{600} \text{ do controle negativo})}{(\text{Abs}_{600} \text{ do controle positivo} - \text{Abs}_{600} \text{ do controle negativo})} \times 100$$

3.15. Marcação de Peptídeos com ^{125}I -NaI

Numa solução contendo 1 nmol de peptídeo foram adicionados 1 mCi de ^{125}I -NaI (REM) e 0,1 volume de cloramina T 3 mg/ml em tampão fosfato 0,5 M, após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente a reação foi parada com 0,2 volumes de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 10 mg/mL em tampão fosfato 0,15 M. A proteína iodada foi purificada por

FPLC numa coluna de fase reversa (PepRPC H5/5-Pharmacia) em TFA 0,1%/H₂O e TFA 10%/ACN. Os peptídeos foram eluídos da coluna por gradiente de acetonitrila (10-60%) em 60 minutos na razão de 1 mL/min. A absorbância foi monitorada a 210 nm e a radioatividade das frações coletadas foi determinada. Essas frações foram secas e ressuspensas em PBS/DMSO 10% com atividade específica de 2×10^7 cpm. μg^{-1} .

3.16. Ligação de Peptídeos Marcados a Células de Cultura

Células LLC-MK₂ foram extraídas das garrafas por tripsinação, recuperadas e lavadas com meio DME sem soro como descrito no item 3.15. Foram preparados em triplicata tubos sem adição de células e tubos contendo 6×10^5 células cada, com e sem 1 μg de peptídeo J competidor não radioativo. Nesses tubos foi adicionado ¹²⁵I-peptídeo J em 8 diferentes concentrações e as amostras foram incubadas por 2 horas em gelo. Após esse período as células foram lavadas uma vez com meio DME/Triton X-100 0,05% e centrifugadas por 1 minuto a 5.000 x g. O precipitado foi solubilizado em SDS 1% por 10 minutos e a radioatividade foi determinada para cada fração.

3.17. Subclonagem e Expressão de Tc85-11

3.17.1. Subclonagem de Tc85-11 sem Regiões Hidrofóbicas por PCR: foram sintetizados os seguintes oligonucleotídeos:

5' TGT GGA GCT ACG CAT ATG CAG GTG GAA AAG GCC 3'

3' TCT CTT CGG CTC GAG TTT CCT GTC CTT GAT TGC AGT CAT 5'

Em **negrito** estão assinalados os sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *XhoI* respectivamente. Esses oligonucleotídeos foram usados para se obter, por PCR a partir do clone Tc85-11, um fragmento menor que, quando traduzido, desse origem a uma proteína recombinante mais solúvel. Este clone foi denominado Tc85-12. A reação foi feita com 0,2 mM dNTP, 500 nM de cada oligonucleotídeo, o tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (Pharmacia) adequadamente diluído, 4 mM de $MgCl_2$, 0,1 $\mu g/20 \mu L$ de DNA do clone Tc85-11 e 4 U de enzima/100 μL . A reação foi feita primeiramente num volume final de 20 μl , até que fossem estabelecidas as melhores condições de temperatura. Uma vez estabelecidas as temperaturas em: 94°C por 1 minuto, 60°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto, num total de 25 ciclos, foi feita uma reação num volume total de 200 μL , capaz de fornecer material suficiente para a clonagem.

3.17.2. Clonagem em Plasmídeo de Expressão: o fragmento de DNA obtido por PCR foi analisado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Este fragmento foi purificado do gel com o kit Prep-A-Gene (New England Biolabs) e digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. A quantidade de DNA foi avaliada, o fragmento foi purificado do gel de agarose como descrito previamente e ligado ao vetor pET 21a (Novagen). A construção foi utilizada para se transformar bactérias *E. coli* da linhagem BL-21, que foram semeadas em meio LB sólido contendo 50 $\mu g/ml$ de ampicilina.

3.17.3. Análise dos Clones Positivos por Mini-Prep: foram inoculados 5 mL de meio LB com cada um dos clones positivos por 18 hs a 37°C, as células foram precipitadas por centrifugação e a extração do DNA plasmidial foi feita segundo o protocolo de mini-prep por lise alcalina descrito em Ausubel *et al.* (1989). Quando

havia necessidade de sequenciamento de DNA dos clones, DNA de plasmídeo foi extraído utilizando-se o kit Flexi Prep (Pharmacia).

3.17.4. Seqüenciamento: aproximadamente 0,5 µg de DNA plasmidial, por reação, foram utilizados para o sequenciamento segundo o método descrito por Sanger *et al.* (1977), com a utilização do kit Big Dye (Perkin Elmer) e aparelho de sequenciamento automático, generosamente colocado à disposição pelo laboratório do Dr. F. Reinach.

3.17.5. Obtenção de Proteínas Recombinantes: a obtenção de pf-Tc85-12 foi feita como descrito no item 3.9, exceto que as bactérias utilizadas foram *E. coli* BL-21 DE3. A purificação da proteína recombinante foi feita em colunas de Níquel como descrito no item 3.10.1 e o rendimento foi de aproximadamente 1 mg de pf-Tc85-12/L de cultura de bactéria.

3.18. Cromatografia de Afinidade no Peptídeo J

O peptídeo J foi sintetizado com uma Cisteína extra, adicionada na região amino-terminal, que favorece seu acoplamento a uma matriz sólida (Ultralink Iodoacetyl-Pierce), segundo as recomendações do fabricante. Esse gel foi dispensado numa coluna e utilizado para experimentos de cromatografia de afinidade como descrito no item 3.10, exceto que o extrato de células LLC-MK₂ utilizado foi preparado em n-octil-β-D-glicopiranosídeo 100 mM e as lavagens desta coluna foram feitas com PBS/n-octil-β-D-glicopiranosídeo 25 mM.

3.19. Preparação da Fração Membranar de Células

A fração membranar foi preparada segundo Brown et al. (1990). Resumidamente, as células foram removidas das garrafas com tripsina, que foi inativada com 5 mL de meio DME/SFB 10% por garrafa de 75 cm². Esse material foi incubado em estufa de cultura a 37°C por 40 minutos, as células foram coletadas, lavadas 2 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 1.500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g por 1 hora, sendo que o precipitado foi solubilizado em tampão fosfato contendo 100 mM n-octil-β-D-glicopiranosídeo. Os componentes insolúveis foram separados por centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado nos ensaios de cromatografia de afinidade em J-Biomatriz e de cross-link químico.

Para evitar a contaminação da preparação com elementos de citoesqueleto celular, após a centrifugação a 100.000 x g o precipitado foi submetido ao tratamento alcalino indicado por Christians et al. (1993), como representado no esquema:

As frações A, B, C, e D foram individualmente submetidas à cromatografia de afinidade em J-Biomatriz.

3.20. Ensaio de Ligação Covalente entre Peptídeos Marcados e Membranas Celulares

Células LLC-MK₂ foram coletadas como descrito no item 3.19 e células K562, que não são aderentes, foram submetidas ao mesmo processo, exceto à tripsinização. A partir dessas células foram preparadas frações membranares como descrito no item 3.19, eliminando-se evidentemente a etapa de solubilização em detergente. Essas frações foram incubadas independentemente com o ^{125}I -peptídeo J na presença e ausência de um excesso de 100 vezes de peptídeo não radioativo por 2 horas em gelo. Os complexos de receptor-ligante foram separados dos ligantes livres por centrifugação a 100.000 x g e lavados uma vez com PBS/Triton X-100 0,01%. A ligação química foi

efetuada com etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC, Sigma) e interrompida com glicina 150 mM, pH 6,8. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS e solubilizadas por 2 horas a 4°C em PBS contendo n-octil-β-D-glicopiranosídeo 100 mM, EDTA 1 mM, aprotinina 2 µg/mL, TLCK 1 mM e PMSF 1 mM. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e os complexos de ¹²⁵I-peptídeo J-receptor foram detectados por radiografia.

3.21. Ligação de ¹²⁵I-CK18 em Células de *T. cruzi*

CK18 (Research Diagnostics) foi marcada com ¹²⁵I (REM) pelo método da cloramina T (item 3.16) e purificada numa coluna de Sepharose G-25. Um total de 9 x 10⁶ tripomastigotas purificados em gradiente de lymphoprep como descrito no item 3.2 e 1,2 x 10⁶ epimastigotas foram incubados com ¹²⁵I-CK18 na presença e ausência de um excesso de 100 vezes de CK18 não radioativa por 2 horas em gelo. Essas misturas foram filtradas em filtros de nitrocelulose previamente saturados com BSA 0,1%. lavados e a radioatividade foi determinada num contador de cintilação.

3.22. Imunofluorescência

Células LLC-MK₂ foram previamente incubadas com lamínulas de vidro de 30 mm recobertas com o peptídeo J por uma hora como descrito no item 3.15. As células foram lavadas com DME e incubadas com o anticorpo anti-PAN-cytokeratin (Sigma) na diluição de 1:400 ou faloidina ligada a rodamina (Sigma) na diluição de 1:200 por 30 minutos a 37°C em DME. Após 5 lavagens com DME, quando necessário, as células

foram incubadas nas mesmas condições com o anticorpo secundário ligado a FITC (Sigma) na diluição de 1:30, lavadas por 3 vezes com DME e 2 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%.

As células K562, que não aderem em superfícies recobertas com o peptídeo J, foram então coletadas por centrifugação a 1.000 x g, lavadas 2 vezes com DME, incubadas com os anticorpos de interesse e fixadas com paraformaldeído 4% como descrito acima. Para a visualização de moléculas do citoesqueleto as células foram fixadas antes da incubação com os anticorpos e permeabilizadas por 15 minutos com saponina 0,05%. Além disso, a incubação com os anticorpos foi feita em DME/saponina 0,05%. O material assim obtido foi analisado por microscopia sob luz fluorescente.

3.23. Invasão de Células de Cultura pelo *T. cruzi*

Um total de 1×10^5 células LLC-MK₂ foram cultivadas em laminulas de vidro de 9 cm² por 48 horas, pré-incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente com pf-Tc85-12 (1 µM), peptídeo J (10 µM), anticorpo anti-PAN-cytokeratin 1:200 ou apenas com meio de cultura. Após este período, foram adicionadas formas tripomastigotas, numa relação de 100 tripanossomas por célula. Esse material foi incubado em estufa de cultura por 2 horas, o excesso de tripomastigotas retirado com 3 lavagens com PBS, 1 lavagem com lymphoprep (Nycomed) e incubadas com lymphoprep por 5 minutos à temperatura ambiente. O lymphoprep com os parasitas restantes foi retirado e as células foram lavadas por mais 3 vezes com PBS e incubadas em meio DME/SFB 2% por 2 dias a 37⁰ C nas mesmas condições descritas para o cultivo de células.

Durante esse período, o *T. cruzi* se diferencia para a forma amastigota, tornando

mais fácil sua visualização no microscópio e subsequente contagem do número de células infectadas. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas por 30 minutos à temperatura ambiente com metanol 100% e reidratadas com PBS/MgCl₂ 125 mM por 2 horas. Após este período a solução foi removida e foram adicionados 500 µl de cromomicina A (Molecular Probes) diluída 1:100 em PBS/MgCl₂ 125 mM para coloração de ácidos nucléicos. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. As lâminas foram divididas em 4 campos e observadas em microscópio de fluorescência. Foram feitas 3 fotos de cada campo, que foram utilizadas para a contagem do número de células infectadas e a quantidade de tripanossomas por células. Os dados foram analisados pelo teste T de Student não pareado.

4. RESULTADOS

4.A. RESULTADOS PRELIMINARES

4.A.1. Caracterização dos Ligantes de *T. cruzi* para Células LLC-MK₂

Para identificar as moléculas de *T. cruzi* que se ligam às células LLC-MK₂, as células foram fixadas e incubadas com extrato de formas tripomastigotas marcadas com ³⁵S-metionina. Após lavagens, os ligantes foram eluídos com NaCl 1 M e uréia 8 M (figura 6A), submetidos a SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e sua reatividade com o mAb H1A10 foi verificada por Western blot (figura 6B). Observa-se que as principais moléculas de tripomastigotas com afinidade por células LLC-MK₂ foram eluídas com NaCl 1M, e têm massa molecular em torno de 85 e 66 kDa. O Western blot corrobora os nossos dados iniciais, mostrando que o mAb H1A10 (específico para a família da Tc85) reconhece moléculas de 85 kDa que têm afinidade por células de mamíferos.

FIGURA 6- Análise das frações de extrato de tripomastigotas metabolicamente marcados com ^{35}S -metionina obtidos após incubação com células LLC-MK₂ fixadas, separados por SDS-PAGE e radiografados. 1- extrato total de tripomastigotas; 2- eluato com NaCl 1 M; 3- eluato com uréia 8 M. A- Radiografia; B- Western blot com mAb H1A10. A seta indica a região de 85 kDa.

4.A.2. Caracterização dos Ligantes de Células LLC-MK₂ para o *T. cruzi*

Os ligantes de células LLC-MK₂ para a forma infectiva do *T. cruzi*, foram caracterizados ao se incubar 3 mg de extrato de células LLC-MK₂ metabolicamente marcadas com ^{35}S -metionina com tripomastigotas fixados. Após lavagens, os ligantes foram eluídos com NaCl 1 M e uréia 8 M. Observa-se que as principais moléculas de tripomastigotas que se ligam a células LLC-MK₂ apresentam massa molecular em torno de 30, 45 e 75 kDa e são eluídas com uréia 8 M. Na fração eluída com NaCl 1 M aparecem as mesmas moléculas, embora com menor intensidade, além de outra banda de aproximadamente 33 kDa (figura 7A).

Na tentativa de se caracterizar as diferenças entre as moléculas que aderem em formas não infectivas e infectivas de *T. cruzi*, epimastigotas foram fixados e incubados com extrato de células LLC-MK₂ como descrito acima. Os resultados apresentados na figura 7B indicam que com NaCl 1 M podem ser eluídas moléculas de massa molecular de aproximadamente 45, 55, 60 and 66 kDa e com uréia 8 M, moléculas de 40 e 66 kDa.

FIGURA 7- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ metabolicamente marcadas com ³⁵S-metionina após incubação com tripomastigotas (A) e epimastigotas (B) fixados, separados por SDS-PAGE e radiografados. 1- eluato com NaCl 1 M; 2- eluato com urea 8 M. A seta indica a região de 45 kDa.

4.A.3. Identificação de Ligantes para a Família da Tc85 em Células LLC-MK₂

Nosso laboratório descreveu a clonagem de um membro da família da Tc85 (Tc85-11), cuja região mais próxima a carboxila terminal (clone Tc85-1) liga-se a laminina e a células de mamífero (Giordano et al, 1994 e 1999). Sendo assim, a

proteína recombinante de aproximadamente 33 kDa expressa pelo clone Tc85-1 (pf-Tc85-1) e reconhecida pelo anticorpo mAb H1A10, foi utilizada como ferramenta para caracterizar os prováveis receptores para o *T. cruzi* em células LLC-MK₂.

O clone Tc85-1 em plasmídeo pTrcHis foi expresso em larga escala em *E. coli* e a pf-Tc85-1 foi purificada primeiramente numa coluna de Níquel (Ni-NTA Superflow/Qiagen) e em seguida numa coluna de gel filtração (Superose 6-Pharmacia). Esse material foi concentrado, dialisado e acoplado à Sepharose ativada por brometo de cianogênio (Pharmacia). O gel foi colocado em uma coluna e utilizado em experimentos de cromatografia de afinidade.

Extrato de células LLC-MK₂ marcadas com ³⁵S-metionina foi cromatografado na coluna de pf-Tc85-1-Sepharose. Após lavagens, as moléculas aderidas foram eluídas com NaCl 1 M, uréia 4 e 8 M. O efluente da coluna foi acompanhado por dosagem da radiação e foi possível observar que a maior parte do material marcado sai nas lavagens com PBS/0,05% NP-40, além de dois picos distintos obtidos após a eluição com NaCl 1 M e uréia 4 e 8 M. Esses eluatos foram submetidos à separação por SDS-PAGE e exposição a filmes de raio-X. Observou-se que as principais moléculas eluídas da coluna com NaCl 1 M são de massa molecular 75 e 45 kDa. Com uréia 4 e 8 M o padrão de moléculas eluídas é o mesmo, porém com uréia 8 M obtém-se maior quantidade. As moléculas eluídas estão na faixa de 45-66 kDa, sendo a de 45 kDa vista com maior intensidade (figura 8).

FIGURA 8- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ marcadas com ³⁵S-metionina obtidas por cromatografia de afinidade em pf-Tc85-1-Sepharose, separadas por SDS-PAGE e radiografadas. 1- eluato total; 2- eluato de NaCl 1 M; 3- eluato de uréia 8 M. A seta indica a região de 45 kDa.

Por Western blot com um anticorpo anti-laminina (figura 9) foi avaliada a relação entre os ligantes da coluna de pf-Tc85-1-Sepharose e laminina. No eluato com NaCl 1 M e uréia 4 M foi possível observar uma molécula de massa molecular maior que 200 kDa, que é reconhecida pelo soro anti-laminina. Além disso, mais nitidamente no eluato de uréia 4 M, pode-se observar uma banda de 66 kDa, que não é albumina, pois, este soro foi previamente testado e não reconhece albumina. Esses resultados estão de acordo com dados anteriores de nosso laboratório, que sugerem a presença de mais de um ligante para Tc85-11, além de laminina, em células de mamífero (Giordano et al., 1999).

FIGURA 9- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ obtidos por cromatografia de afinidade em pf-Tc85-1-Sepharose por Western blot com anticorpo anti-laminina 1. 1- extrato total de células; 2- eluato com NaCl 1 M; 3- eluato com uréia 4 M; 4- eluato com uréia 8 M.

FIGURA 10- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ obtidos por cromatografia de afinidade em pf-Tc85-1-Sepharose por Western blot com anticorpo anti-tubulina (15 µg/ml). 1- extrato total de células; 2- eluato com NaCl 1 M; 3- eluato com uréia 8 M. A seta indica a região de 45 kDa.

Devido à semelhança entre as massas moleculares da molécula de 45 kDa e a da tubulina (aproximadamente 55 kDa), foi feito um Western blot das frações de células eluídas de pf-Tc85-1-Sepharose com anticorpo anti-tubulina (Sigma). Embora tubulina esteja presente na fração uréia 8 M de pf-Tc85-1-Sepharose, ela não co-migra com a molécula de 45 kDa (figura 10).

Levando-se em conta que moléculas de 45 kDa de extrato de células LLC-MK₂ se ligam a tripomastigotas fixados (figura 7A), mas não em epimastigotas fixados (figura 7B) e que tais moléculas são eluídas de pf-Tc85-1-Sepharose (figura 8), optamos por purificar e caracterizar a molécula de células LLC-MK₂ de 45 kDa.

4.A.4. Caracterização da Molécula de 45 kDa que Liga em pf-Tc85-1

Foram feitas várias tentativas de se purificar a molécula de 45 kDa a partir da coluna de pf-Tc85-1. Primeiramente, com o intuito de se obter uma eluição mais específica, foram utilizados diferentes eluentes. Células LLC-MK₂ metabolicamente marcadas com ³⁵S-metionina foram lisadas com NP-40 e incubadas com pf-Tc85-1-Sepharose. Após lavagens com PBS e NaCl 1 M, a coluna foi repartida em quatro frações, respectivamente eluídas com mAb H1A10 (0,1 mg/mL) e pf-Tc85-1 (0,3 mg/mL). Os melhores resultados foram obtidos com o pf-Tc85-1, quando foi observada uma molécula de aproximadamente 45 kDa (figura 11). Lamentavelmente a pf-Tc85-1 migra muito próximo da região de 45 kDa. Além disso, a pf-Tc85-1 forma agregados de aproximadamente 60 kDa que também podem contaminar a purificação. A eluição com o mAb H1A10 não foi eficiente e nenhuma molécula pôde ser eluída da coluna.

Provavelmente a afinidade da pf-Tc85-1 por seu receptor em células é maior que sua afinidade pelo anticorpo monoclonal.

FIGURA 11- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ marcadas com ³⁵S-metionina obtidas por cromatografia de afinidade em pf-Tc85-1-Sepharose, separadas por SDS-PAGE e radiografadas. 1 e 4- fração eluída com uréia 8 M; 2- com pf-Tc85-1; 3- com mAb H1A10. As setas indicam a região de 45 kDa.

Deste modo, após cromatografia de afinidade de 0,1 mg do extrato de células LLC-MK₂ em pf-Tc85-1-Sepharose e separação do eluato de uréia 8 M por SDS-PAGE, o gel foi corado com Coomassie blue e a banda de 45 kDa foi cortada e eletroeluída. As moléculas assim preparadas foram separadas novamente por SDS-PAGE e a banda de 45 kDa foi inoculada em camundongos para a obtenção de anticorpos monoclonais. Embora este procedimento tenha sido realizado por mais de uma vez, as células híbridas morreram sempre, levantando a suspeita, não demonstrada, de que a molécula de 45 kDa seja importante para a sobrevivência celular.

Outra tentativa de se aprimorar as condições de purificação da molécula de 45 kDa, foi a determinação de seu ponto isoeletrico, em torno de 5,2, por eletroforese bidimensional. Por esta técnica foi possível observar que a maioria das moléculas com afinidade pela pf-Tc85-1, eluídas com uréia 8 M tem pI na faixa de 5-7 (figura 12), levando a um acúmulo de moléculas nessa região do gel e dificultando a purificação da molécula de 45 kDa.

FIGURA 12- Análise da fração do extrato de células LLC-MK₂ marcadas com ³⁵S-metionina eluída com uréia 8 M de pf-Tc85-1-Sepharose, separada por eletroforese bidimensional e radiografada. A seta indica a molécula de 45 kDa.

Além disso, também foram realizados experimentos de separação de moléculas de células LLC-MK₂ por cromatografia numa coluna de troca iônica (Mono Q 5/5 para HPLC - Pharmacia). As frações eluídas por um gradiente de 0 a 0,5 M KCl foram analisadas por SDS-PAGE e aquelas contendo moléculas na faixa de 45 kDa foram cromatografadas na coluna de pf-Tc85-1-Sepharose. Esse procedimento também não eliminou a presença de outras moléculas de massa molecular em torno de 45 kDa

contaminando a purificação.

Devido às dificuldades na obtenção de uma banda única e em quantidade suficiente para caracterização do ligante de 45 kDa, outro enfoque experimental foi utilizado. Para se determinar o sítio de Tc85-1 responsável pela adesão celular e identificar o seu receptor na célula hospedeira, a Tc85-1 foi dividida em 11 peptídeos (A-K) de aproximadamente 15 aminoácidos cada (figura 3), que foram sintetizados na UNIFESP pelo grupo do Dr. Luiz Juliano e Dra Maria Aparecida Juliano.

4.B. IDENTIFICAÇÃO DO DOMÍNIO DA FAMÍLIA Tc85 QUE SE LIGA A CÉLULAS LLC-MK₂

4.B.1. Mapeamento do Sítio de Tc85-1 Responsável pela Adesão Celular

A capacidade de células de mamíferos aderirem a cada peptídeo foi testada, baseando-se no princípio de que células LLC-MK₂ incubadas com meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino a 37° C por 1 hora aderem em placas de poliestireno, enquanto que na ausência de soro fetal as células não aderem. Sendo assim, os poços de uma placa de 24 poços foram recobertos com os peptídeos sintéticos e incubados com células LLC-MK₂ em meio DME sem soro. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas e a observação dos poços no microscópio invertido revelou que as células aderem significativamente apenas nos poços recobertos com o peptídeo J (figura 13).

FIGURA 13- Análise por microscópio invertido da adesão de células LLC-MK₂ em poços recobertos com os peptídeos A-K, que correspondem em sequência ao clone Tc85-1. Como controle as células também foram incubadas em poços recobertos com albumina bovina (BSA).

Outras linhagens celulares foram testadas para avaliar sua adesão ao peptídeo J (tabela 2). Segundo os dados da tabela, referentes às observações feitas ao microscópio, podemos concluir que células de diferentes linhagens têm a capacidade de aderir e crescer em superfícies recobertas pelo peptídeo J. Entre essas células estão células tumorais (B16F10), células endoteliais de cordão umbilical humano (ECV), células macrofágicas (J-1774), células de adenocarcinoma de camundongos e células

endoteliais de rim de macaco (LLC-MK₂). Significativamente, eritrócitos de camundongos e células de eritroleucemia K562, que não são infectadas pelo *T. cruzi* (Ruiz et al., 1998), não aderem ao peptídeo J.

CÉLULAS	ADESÃO	
	peptídeo J	BSA
B16F10	+	0
ECV	+	-
J774	+	-
PC-12	+	-
LLC-MK ₂	+	-
K562	0	0
eritrócitos	0	0

TABELA 2- Adesão de células de mamífero em poços forrados com o peptídeo J. Os sinais (+) indicam células aderidas cobrindo todo o poço; (-) 3 a 4 células aderidas e (0) não há células aderidas.

4.B.2. Afinidade do Peptídeo J por Células de Mamífero

O peptídeo J foi marcado com Iodo não radioativo e experimentado quanto à sua capacidade de aderir em células, como anteriormente descrito, para avaliar se a iodação interfere na interação entre o peptídeo e a célula. Visto que, a iodação não interfere na adesão, o peptídeo J foi marcado com ¹²⁵I purificado por cromatografia de fase reversa num gradiente de 10-60% de acetonitrila solubilizado em água com 10% DMSO.

Após dosagem da radioatividade, diferentes concentrações do ^{125}I -peptídeo J foram incubadas com células LLC-MK₂ na presença e ausência de um excesso de 100 vezes de peptídeo J não radioativo. Esse material foi lavado, as células foram lisadas e a radioatividade de cada amostra foi determinada. Por análise de saturação não linear, se determinou $1,66 \times 10^6 \pm 0,16 \times 10^6$ sítios de ligação para o ^{125}I -peptídeo por célula e um K_D de 175 ± 56 nM.

FIGURA 14- Análise de saturação não linear da adesão de quantidades crescentes de ^{125}I -peptídeo J em células LLC-MK₂ na presença e ausência de um excesso de 100 vezes de peptídeo não radioativo. Cada ponto representa a média $\pm$ SE de determinações em triplicata.

4.B.3. Mapeamento dos Aminoácidos do Peptídeo J Envolvidos na Adesão Celular

Esses experimentos sugerem a importância do peptídeo J na adesão do parasita à célula do hospedeiro vertebrado. Nota-se que o peptídeo J contém o motivo VTVxNVfLYNR, altamente conservado na família das trans-sialidases (figura 15). Sendo assim, para avaliar a importância desse motivo na adesão do peptídeo em células, foram sintetizados 4 peptídeos menores, de 9-10 aminoácidos, cujas seqüências correspondem à do peptídeo J. Esses peptídeos foram utilizados em solução (100 μ M) para inibir a adesão de células LLC-MK₂ em poços recobertos como peptídeo J (figura 16). Os mini-peptídeos A, B e D bloqueiam parcialmente a adesão de J em células, sugerindo uma seqüência comum entre os três mini-peptídeos, responsável pela adesão celular (sublinhada na figura 16).

Tc85-11	GKKPSVTVTNVFLYNRPLNS
X70949	SDSIQ...S..L....L.QD
s32016	SDSIQ...S..L....L.QD
jh0823	SDSIH...S..L....L.KD
ph1919	SGSVH...S..L....L.KD
s32017	SGNVH...S..L....L.KD
U59297	SGNIH...S.AL....L.QD
AF091620	SG.IHA..A.....E
AF092099	SR.IHA..A.....E
AAB97874	SR.IHA.LA.....D
AAB97875	SR.IHA..A.....E
AF051695	EGSSP...AD.L....I.YD
D50684	PTISH...N..L....Q..A
BAA09333	PTISH...N..L....Q..A
AAA66352	PTISH...N..L....Q..A
AAA99444	PTISH...N..L....Q..A
BAA09334	PTISH...N..L....Q..A
s23006	PTISH...N..L....Q..A
BAA09335	PTISHL.AN..L....Q..A
AAC98544	PTESHL.AK.....Q..A
p23253	SSDCHI.....M....I.KP
U02615	DSGSDA.L.D.....SV
s44237	.DSG.A.L.D.....SV
U02613	.SGSDA.L.D.....SV
a45596	DSGSDA.L.D.....SV
U02614	DSGTDA.L.D.....SV
L13844	DSGSNA..KD....S...SA
L14824	K.SS....K.....GA
U77951	DSDS.....SV
U74494	.DSGDL....S.....SE
q03877	AQ.TK.....
AF051696	I.NFP...K.....P
L11287	I.NFP...K.....P
U11498	.Q.TN.K.K.....
u50162	.Q.TK.....
M62736	H.....P
p18270	H.....P
p18269	R.....
p18271	SQESH.....~::~~
a24154	RQRQRA.L.D.....SV

FIGURA 15- Comparação da região do peptídeo J com outras moléculas de *T. cruzi* descritas em bancos de dados. Os pontos indicam aminoácidos idênticos e os números na coluna da esquerda correspondem ao número das seqüências depositadas no GenebankTM. O número de acesso do clone Tc85-11 no GenebankTM é AF085686.

FIGURA 16- Adesão de células LLC-MK₂ a poços recobertos com o peptídeo J na presença de 100 μ M de cada um dos mini-peptídeos assinalados. Considerou-se 100% a adesão de células em peptídeo J na ausência de qualquer peptídeo em solução. Cada barra representa a média de determinações em triplicata. Os aminoácidos importantes para adesão estão sublinhados

O mini-peptídeo B (VTVTNVFLYN) apresentou o melhor efeito inibitório sobre a citoaderência em peptídeo J. Deste modo, o mini-peptídeo B foi utilizado como modelo para a síntese de três peptídeos ainda menores, que facilitassem a caracterização dos aminoácidos do peptídeo J relevantes para adesão em células. Os miniB-peptídeos (100 μ M) também foram utilizados para inibir a adesão de células LLC-MK₂ em J (figura 17). Embora todos os miniB-peptídeos inibissem a adesão, mini-B1 foi o mais eficiente, seguido por mini-B3 e mini-B4. A presença de Arginina em mini-B2 parece ter reduzido significativamente a adesão em células. De qualquer modo,

a análise dos resultados indica que o melhor efeito inibitório é obtido com o maior dos peptídeos, mini-B1.

FIGURA 17- Adesão de células LLC-MK₂ a poços recobertos com o peptídeo J na presença de 100 μ M de cada um dos miniB-peptídeos assinalados. Considerou-se 100% a adesão de células em peptídeo J na ausência de qualquer peptídeo em solução. Cada barra representa a média de determinações em triplicata.

Uma outra forma de avaliar a importância de cada resíduo do peptídeo J na interação com a célula hospedeira, foi pela substituição de cada um de seus aminoácidos por Alanina. Como modelo foi utilizado o mini-peptídeo D, cuja sequência contém os aminoácidos implicados em adesão pelos experimentos anteriores. Os peptídeos substituídos foram usados para inibir a adesão de células em J (figura 18). Por esse método, os aminoácidos mais importantes para a adesão são VTxVFLYxR. De

acordo com os experimentos anteriores, esses dados sugerem que a sequência VTxVFLYxR, que contém os aminoácidos mais conservados do motivo comum a todos os membros da família das trans-sialidases (figura 15) está envolvida na adesão em células de mamífero.

FIGURA 18- Adesão de células LLC-MK₂ a poços recobertos com o peptídeo J na presença de 100 μ M de cada um dos peptídeos substituídos por Alanina (sublinhados). Considerou-se 100% a adesão de células em peptídeo J na ausência de qualquer peptídeo em solução. Cada barra representa a média de determinações em triplicata.

4.B.4. Expressão de pf-Tc85-11

Para se avaliar a importância do peptídeo J na interação de Tc85-11 com a célula do hospedeiro vertebrado, o clone Tc85-11, que contém a sequência completa do cDNA da Tc85, foi subclonado no vetor de expressão pET 21a para a obtenção da proteína recombinante. A quantidade de proteína obtida foi insuficiente e, mesmo depois de várias tentativas, a expressão continuava a ser muito baixa. Isto pode ter ocorrido, em virtude da elevada massa da molécula ou de regiões hidrofóbicas presentes nas terminações N e C (figura 19).

Deste modo, após uma análise da sequência da Tc85-11, foram desenhados dois oligonucleotídeos (figura 19), contendo sítios de restrição para as enzimas NdeI, no sentido direto e XhoI, no sentido reverso. Com esses oligonucleotídeos foi possível obter por PCR um fragmento do clone Tc85-11 com reduzidas regiões hidrofóbicas e este fragmento foi clonado no vetor pET 21a. O sentido da clonagem foi confirmado após o sequenciamento e com o novo clone de Tc85-11 (Tc85-12) foi possível obter a proteína recombinante pf- Tc85-12 em maior quantidade.


```

M S R R V F A S A V L L L L L V L C C D R G A T T A
ATG TCC CGG CGT GTG TTT GCT TCT GCG GTG CTG CTC CTC CTC CTC GTG TTG TGC TGC GAC CGT GGA GCT ACG ACC GCT
Q V E K A T D A S T P S G S A L T G A I T A A G S A
CAG GTG GAA AAG GCC ACT GAT GCC TCA ACT CCT TCT GGG TCG GCT TTG ACG GGT GCC ATT ACT GCA GCG GGG AGT GCT
S G S V E S I L F V P Q T T Q V L Q K T G T G S S G
TCA GGG AGT GTT GAG TTG CCG CAG GAG TCG ATC CTA TTT GTT CCG CAG ACG ACG CAG GTG CTG CAG AAG ACG GGG ACT
R D S F E L P Q V S P S L V S A G G V I A A F A E G
GGC TCA AGT GGG AGG GAT TCA TTT GTT TCA CCC TCT CTC GTC AGT GCT GGT GGA GTA ATT GCT GCT TTT GCT GAA GGT
R I N A K N T S P T E S T K P S S D V V A E Y I D S
CGC ATA AAT GCC AAA AAC ACC TCC CCT ACC GAA TCA ACT AAG CCG TCT TCT GAT GTT GTT GCG GAG TAC ATC GAC TCT
A W E W S T L V E K V K K K E W R A R T V L G K A E
GCG TGG GAA TGG TCC ACT CTT GTC GAA AAG GTC AAA AAG AAA GAA TGG AGG GCA CGC ACC GTG CTT GGT AAA GCG GAG
G N E S F D V V V R H P T T I M K G N K V F L L V G
GGA AAT GAG AGT TTT GAT GTT GTT GTG CGC CAC CCC ACA ACA ATC ATG AAG GGC AAT AAG GTG TTT CTT GTG GGA
S T A L S V V N E S W K E G S L E I K L V V G E V T
AGC ACT GCC TTG TCC GTT GTA AAT GAG AGT TTG AAA GAG AGC AGC TTG GAA ATA AAA CTG GTT GTT GGT GAG ATC GAG
K P T D S E P S K R I E W G E I N S P L N G S T L A
AAG CCC ACG GAC AGC GAG CCG AGT AAA CCG ATC GAA TGG GGC GAA ATC AAC TCT CCG TTG AAC GGG AGT TTA GCT
A H K G K L T E C L A S G G S G V L M E D G A L V F
GCT CAC AAA GGT AAA TTG ACG GAG TGC CTT GCT TCT GGT GGC TCG GGT GTT CTG ATG GAG GAT GGC GCG CTT GTG TTT
S L M A V N E K N D G V Y S M I I Y S K D N G S T W
TCA CTG ATG GCG GTG AAT GAA AAA AAC GAT GGC GTT TAC TCC ATG ATT ATT TAC TCG AAG GAC AAC GGC AGT ACC TGG
A L S E D M S P A N C T D P R I T E W E G S L L M I
GCG CTC TCT GAG GAC ATG TCA CCT GCG AAC TGC ACT GAC CCC GCG ATC ACC GAG TGG GAA GGA TCA CTT CTC ATG ATT
V D C E N E Q R V Y E S C D M G K T W T E A I G T L
GTT GAC TGC GAG AAC GAA CAG AGG GTG TAC GAG TCG TGT GAC ATG GGG AAA ACG TGG ACG GAG GCC ATC GGG ACG CTT
P G V W V N S Q S E D Y P E G V L R V D A L I T A S
CCA GGC GTG TGG GTC AAT TCA CAG TCG GAA GAC TAT CCG GAA GGA GTC TTG CGT GTG GAT GCC CTC ATC ACC GCG AGC
I E D R K V M L Y T Q R G Y A S G G E A E R A L Y L
ATT GAG GAC AGG AAG GTC ATG CTG TAC ACT CAG AGA GGG TAC GCG TCG GGG GGT GAA GCG GAA AGA GCG CTC TAT CTT
W V T D N N R S F F V G P V G M D N A V S G D L T S
TGG GTG ACG GAC AAC AAC CCG TCG TTT TTT GTT GGA CCG GTT GGC ATG AAT GCT GTG AGT GGG GAT CTC ACC AGC
S L L Y S D G K L H L L Q R R G N S E R S V I S L S
AGC CTG CTG TAC TCG GAT GGC AAG TTG CAT CTT TTA CAA CGG AGG GGC AAC AGT GAA CCG AGT GTC ATC TCA CTT TCC
R L T E E L S T I N S V L K T W A Q N D A F F S N L
CGC CTG ACG GAG GAA CTG AGT ACA ATC AAT TCT GTC CTG AAG ACC TGG GCG CAA AAT GAC GCC TTT TTC TCC AAC TTG
S I P T A G L V A V L S N A S A S G D T W N D E Y L
TCT ATA CCC ACG GCG GGT CTG GTG GCG GTA TTG TCA AAC GCA TCG GCC AGC GGT GAC ACG TGG AAC GAC GAG TAC CTT
C L N A T V K N A T K V K D G F Q L Q E P D S R A I
TGC CTG AAT GCA AGT GTG AAA AAC GCC ACG AAG GTC AAG GAT GGG TTT CAA TTG CAG GAG CCT GAC TCC AGG GCA ATA
W P V N T Q G D N V R H I S L S H N F T L V A S V T
TGG CCC GTG AAC ACT CAG GGT GAT AAT GTG CGT CAT ATA TCT TTG AGC CAC AAC TTC ACA CTT GTG GCG TCG GTG ACC
I E E A P S E K T L L T A V L G N T E P P Y I M R L
ATC GAA GAG GCC CCG AGC GAG AAA ACT CTA CTG ACT GCG GTG TTG GGG AAC ACT GAG CCC CCG TAT ATC ATG AGA CTG
S Y T A D N K W E T M L K D E K T T R R S T W E L K
TCG TAC ACC GCG GAT AAC AAG TGG GAG ACT ATG CTG AAG GAC GAG AAA ACA ACA CCG AGG AGC ACT TGG GAG CTT AAG
K E Y Q V A L M L Q G N K R S V Y V D G E L L G E E
AAA GAA TAC CAA GTG GCA CTC ATG CTG CAA GGC AAC AAG AGA TCC GTG TAC GTT GAT GGT GAG TTG CTG GGG GAA GAA
E V P L T G E T P L E F G F C F G A C G E D D G
GAA GTG CCG TTA ACA GGT GAG ACA CCA CTT GAG CTT TTT GGG TTT TGC TTT GGC GCG TGC GGT GAG GAT GAT GAT GGG
E E P S P E E I G K K P R V T V T N V F L Y N R P L
GAG GAG CCC AGT CCG GAG GAG ATC GGC AAA AAA CCT CGT GTG ACG GTG ACG AAC GTC TTT CTG TAC AAC CCG CTA CTG
N S T E M T A I K D R K P V P K R A P E P Q V K I V
AAT TCC ACT GAG ATG ACT GCA ATC AAG GAC AGG AAA CCC GTT CCG AAG AGA GCT CCA GAA CCA CAA GTG AAA ATT GTT
P N P V A P A V S A V P G P R E L P A A P G R T T V
CCT AAT CCT GTC GCA CCT GCT GTG TCT GCT GTA CCT GGC CCA CCG GAA TTA CCA CCA CCA CCG GGG AGG ACA ACT GTG
G R T A N T Q H A P A G R L T S A G N E G T A R E K
GGG AGA ACC GCC AAT ACC CAA CAT GCG CCA GCG GGA CCG TTG ACT TCT GCT GGG AAT GAA GGG ACG GCA CGA GAA AAG
G D G G A N G D A G S A Y G R E L L P M L L L L G L
CCT CAT CGT CCG CCA AAT CGT CAT CCT CCT TCC CCG TAC CCG AGC GAA CTC CTC CCG ATC CTG CTT CTC CTC CCA CTC
W A L A T A
TGG GCC CTT GCG ACT GCG TGA

```

FIGURA 19- Sequência de DNA e de aminoácidos do passo de leitura aberto do clone da Tc85-11. As regiões sublinhadas correspondem aos oligonucleotídeos direto e reverso, respectivamente, sintetizados para a obtenção do clone Tc85-12 e a região em amarelo corresponde ao clone Tc85-1.

4.B.5. Importância da Região do Peptídeo J na Interação entre a pf-Tc85-11 e a Célula Hospedeira

Com o objetivo de se avaliar a importância do peptídeo J na adesão de membros da família da Tc85, proteínas recombinantes relativas ao clone completo (pf-Tc85-12) e laminina foram utilizadas em ensaios de inibição da adesão de células LLC-MK₂ em J. Poços de poliestireno foram recobertos com Tc85-12 e incubados com células na presença de Tc85-1 e peptídeo J. Como indicado na figura 20, 0,01 mM de peptídeo J é suficiente para inibir completamente a adesão de células em pf-Tc85-12, sugerindo que o peptídeo J seja de fundamental importância na interação do parasita com a célula hospedeira.

Por outro lado, o peptídeo J não foi capaz de inibir a adesão de células em pf-Tc85-1, levantando a hipótese, não comprovada, de que pf-Tc85-1 e pf-Tc85-12 possam adquirir conformações estruturais diferentes e expor diferentes sítios de ligação à célula hospedeira. Além disso, embora J seja a única região de Tc85-1 capaz de se ligar às células, outras regiões localizadas na porção amino terminal de Tc85-11 também podem participar do processo de adesão, promovendo ou mesmo modulando a ligação de Tc85-1 em células.

Sabe-se que pf-Tc85-1 adere em laminina (Giordano et al., 1994 e 1999). Desse modo, é provável que fragmentos de laminina ainda acoplados à célula hospedeira possam ser responsáveis pela adesão de células em pf-Tc85-1 na presença do peptídeo J. De fato, o peptídeo J não inibe a adesão de células em laminina, portanto não compete com laminina pelo mesmo receptor da superfície celular, nem adere em laminina no mesmo receptor usado por células.

Quando o agente inibitório utilizado foi a pf-Tc85-1 (figura 20), observou-se que essa molécula inibe a adesão de células em pf-Tc85-12. Em concentrações maiores do que 0,01 mM, contudo, ainda restam células aderidas, sugerindo que a região da pf-Tc85-1 não é a única envolvida no processo de adesão. Em relação à laminina, a pf-Tc85-1 atua aumentando a adesão de células em laminina, porém esse efeito é inversamente proporcional à concentração de pf-Tc85-1 em solução. A partir desses dados pode ser levantada a hipótese de que primeiramente a pf-Tc85-1 se liga às células pela região do peptídeo J, e então se liga em laminina, formando uma ponte. Deste modo, as células aderem em laminina através de seus receptores específicos para laminina e pela pf-Tc85-1. A pf-Tc85-12 também aumenta a adesão celular em laminina, de forma semelhante à pf-Tc85-1. Esses dados sugerem que a interação entre membros da família da Tc85 e a laminina está contida na região da pf-Tc85-1.

É interessante notar, ao se comparar os valores de absorbância não transformados, que o número de células que aderem em pf-Tc85-12 ($Abs_{600} = 0,389$) e em pf-Tc85-1 ($Abs_{600} = 0,576$) é similar ao de células que aderem em laminina ($Abs_{600} = 0,385$), sugerindo a função de adesão celular à Tc85 e seus fragmentos. Além disso, embora seguissem o mesmo padrão de adesão acima descrito, foi possível observar grande variação do número de células que aderiam nos poços de um experimento para outro. Numerosas possíveis variáveis foram experimentadas: qualidade e marca das placas, tempo de secagem dos peptídeos nos poços, lotes de células, meio e peptídeos, além do estágio de confluência das células. Foi possível observar que, células confluentes ou muito confluentes aderiam pouco nos peptídeos, enquanto que células extraídas em estágio semi-confluyente aderiam muito bem (resultados não apresentados). Já havia sido sugerido que formas tripomastigotas invadem melhor células semi-confluentes

(Schenkman et al., 1988) e nossos estudos com os polipeptídeos corroboram esta hipótese. Ficou então padronizado o subcultivo de $1,5 \times 10^6$ células LLC-MK₂ em garrafas de 75 cm², 48 horas antes da realização do experimento, garantindo uma variação na absorbância de aproximadamente 20% de um experimento para outro.

FIGURA 20- Adesão de células LLC-MK₂ a poços recobertos com pf-Tc85-12 e laminina na presença de diferentes concentrações do peptídeo J. Considerou-se 100% a adesão de células a pf-Tc85-12 ou a laminina, na ausência de qualquer peptídeo em solução. Cada barra representa a média de determinações em triplicata.

4.B.6. Importância de Íons Divalentes na Adesão de Células em Membros da Família da Tc85

Vários estudos sugerem que a entrada de *T. cruzi* nas células do hospedeiro vertebrado é dependente de íons bivalentes (Burleigh & Andrews, 1998). Sendo assim, foram avaliados os efeitos de EDTA e EGTA sobre a adesão de células em pf-Tc85-12, pf-Tc85-1 e no peptídeo J (figura 21). Pode-se observar que EDTA inibe de maneira dose dependente a adesão de células nos peptídeos, sendo que, a inibição da adesão em J é mais eficiente, sugerindo uma dependência de íons divalentes nesse caso. As diferentes respostas de cada peptídeo em relação à concentração de EDTA enfatizam a nossa hipótese de que a pf-Tc85-1 é muito importante na adesão de Tc85 em células, porém, outros componentes da molécula também devem atuar de forma significativa por diferentes mecanismos.

Na presença de EGTA, a importância de íons Ca^{2+} torna-se mais evidente para adesão celular nos peptídeos. Com concentrações maiores que 2 mM de EGTA foi possível obter inibição total de adesão de células em pf-Tc85-12. Por outro lado, a adesão em pf-Tc85-1 não foi totalmente inibida, mas parece ter se aproximado de uma fase estacionária a partir da concentração de 2 mM de EGTA.

A

B

FIGURA 21- Adesão de células LLC-MK₂ a poços recobertos com o peptídeo J, pf-Tc85-1 e com pf-Tc85-12 na presença de diferentes concentrações de EDTA (A) e EGTA (B). Considerou-se 100% a adesão de células aos peptídeos imobilizados. Cada barra representa a média de determinações em triplicata.

4.B.7. Interação do Peptídeo J com Moléculas de Adesão Celular

Para avaliar a relação entre o peptídeo J e outras já conhecidas moléculas de adesão da membrana celular, como integrinas, diferentes anticorpos foram utilizados para tentar inibir a adesão de células no peptídeo J (figura 22). Os policlonais anti-LLC-MK₂ e anti-pf-Tc85-1 inibiram a adesão menos do que 50%, o primeiro provavelmente por aderir em diferentes moléculas da superfície celular e o segundo por poder ter alguma afinidade pelo peptídeo J.

Quando experimentados diferentes anticorpos anti cadeias α e β de integrinas, foi possível observar que os anticorpos anti- α_5 e anti- β_1 são capazes de inibir totalmente a adesão de células no peptídeo J. Esses dados sugerem que o ligante para o peptídeo J nas células seja uma integrina, ou seja, dependente da atividade de integrinas. A integrina $\alpha_5\beta_1$ é citada na literatura como o receptor de fibronectina por se ligar à seqüência RGD da molécula (Newham & Humphries, 1996). Cerca de 50% de inibição também foi observada na presença de anti- β_2 , sugerindo que mais do que uma integrina possa estar envolvida.

Anti CD-47 (Pharmlingen) é um anticorpo contra um receptor de trombospondina também denominado IAP (proteína associada a integrinas). IAP atua em conjunto com integrinas, é expressa em todas as células e tem importante função na migração de células pelo endotélio e na transdução de sinais para a regulação do fluxo de Ca^{2+} através de membranas celulares (Porter & Hogg, 1998). Devido à similaridade de massa molecular dessa proteína com a molécula de 45 kDa purificada da coluna de pf-Tc85-1-Sepharose, este anticorpo foi utilizado neste experimento, pois seu uso para

Western blot não é recomendado. Anti-CD-47 não inibiu a adesão de células no peptídeo J, porém aumentou-a em 50%, sugerindo que a ativação de integrinas e a sinalização por íons Ca^{2+} esteja envolvida no processo de adesão.

FIGURA 22- Adesão de células LLC-MK₂ a poços recobertos com o peptídeo J, na presença de diferentes anticorpos. Considerou-se 100% a adesão de células em peptídeo J. Cada barra representa a média de determinações em triplicata.

4.B.8. Interação entre o Peptídeo J e Elementos da Matriz Extracelular

Com o objetivo de se avaliar a relação entre o peptídeo J e RGD, foram feitos ensaios de inibição da adesão de células ao peptídeo J por RGD, fibronectina e outros elementos de matriz extracelular que também têm afinidade por integrinas (figura 23). Não foi possível padronizar as concentrações das moléculas da matriz extracelular, devido à solubilidade.

RGD inibe pouco a adesão de células ao peptídeo J, menos de 50% na concentração de 100 μM , sendo que em 10 μM não se observa inibição. Além disso, praticamente não inibe a adesão celular em pf-Tc85-12 (20% de inibição com 100 μM). Esses dados indicam que RGD e J não competem pelo mesmo sítio de adesão, sugerindo que a integrina $\alpha_5\beta_1$ não é o receptor direto do peptídeo J. Quando observados os efeitos da fibronectina esta hipótese é reforçada, pois a fibronectina também não inibe a adesão celular em J ou em pf-Tc85-12 e em maiores concentrações aumenta a adesão. Contudo, quanto maior a concentração de molécula de adesão utilizada, maior a inespecificidade da adesão celular, já que, embora os poços tenham sido bloqueados com BSA, essas moléculas podem aderir aos poços e promover adesão celular.

Trombospondina inibe totalmente a adesão de células ao peptídeo J na concentração de 0,1 μM e em até 50% à pf-Tc85-12. Em concentrações menores, a trombospondina aumenta a adesão.

RGD **FIBRONECTINA** **TROMBOSPONDINA**

FIGURA 23- Adesão de células LLC-MK₂ em poços recobertos com o peptídeo J e com pf-Tc85-12 na presença de diferentes concentrações (indicadas em μM na legenda de cada gráfico) de moléculas da matriz extracelular. Considerou-se 100% a adesão de células ao peptídeo J ou à pf-Tc85-12. Cada barra representa a média de determinações em triplicata.

4.C. IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE CÉLULAS LLC-MK₂ PARA O LIGANTE DA FAMÍLIA DAS TRANS-SIALIDASES

4.C.1. Caracterização dos Ligantes da Célula Hospedeira para o Peptídeo J

Nossos resultados, assim como dados da literatura, indicam que a interação entre o parasita e a célula do hospedeiro vertebrado envolve diferentes moléculas e um complexo sistema de receptores e ligantes. Para melhor compreensão desse fenômeno torna-se necessária a caracterização do receptor para o peptídeo J. Sendo assim, o peptídeo J foi acoplado a uma matriz sólida (Ultralink-Pierce) e utilizado em experimentos de cromatografia de afinidade.

Devido às indicações anteriores do envolvimento de integrinas na adesão do peptídeo J em células de mamífero, a coluna de J-Biomatriz foi incubada com extrato de células LLC-MK₂ lisadas com n-octilglicosídeo como descrito por Pytela et al. (1987) para a purificação de integrinas. As frações eluídas com NaCl 1 M, EDTA 10 mM e uréia 8 M foram dialisadas e separadas por SDS-PAGE e foi observado que a principal molécula eluída na fração EDTA e uréia 8 M tem massa molecular de aproximadamente 45 kDa. Na fração uréia 8 M também se observam moléculas de aproximadamente 100 kDa, semelhante à massa molecular de integrinas, porém, essas moléculas não são reconhecidas por anticorpos anti-integrinas por Western blot nem por imunoprecipitação. Vale lembrar que uma molécula de 45 kDa também pode ser eluída de formas tripomastigotas fixadas e de uma coluna de pf-Tc85-1-Sepharose, enfatizando a sua importância.

FIGURA 24- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ marcadas com ³⁵S-metionina obtidas por cromatografia de afinidade em J-Biomatriz, separadas por SDS-PAGE e radiografadas. 1-extrato total; 2- eluato de NaCl 1 M; 3- eluato de uréia 8 M. A seta indica a região de 45 kDa.

Para avaliar se o ligante de células LLC-MK₂ para o peptídeo J está na membrana plasmática, as moléculas de superfície dessas células foram biotiniladas. As células foram lisadas mecanicamente e a fração membranar foi solubilizada com n-octilglicosídeo. Esse extrato foi incubado com a coluna de J-Biomatriz e foram feitas eluições com NaCl 1 M e uréia 8 M. Após separação das frações por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose que foi testada por Western blot com extravidina acoplada à peroxidase (Extravidin-Sigma). Na figura 25 pode ser observada uma molécula biotinilada de 45 kDa na fração eluída com uréia 8 M. Moléculas de 50–66 kDa também são eluídas com uréia 8 M, porém essas proteínas não são biotiniladas e provavelmente não estão na superfície.

FIGURA 25- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ biotinizadas obtidas por cromatografia de afinidade em J-Biomatriz por Western blot com avidina-peroxidase (Extravidin-Sigma) 1:200. 1 -eluato total; 2- eluato de NaCl 1 M; 3- eluato de uréia 8 M. A seta indica a região de 45 kDa.

Desse modo, para se caracterizar qual(is) molécula(s) de células LLC-MK₂ eluídas de J-Biomatriz se liga diretamente ao peptídeo J, esse peptídeo iodado foi ligado covalentemente às membranas plasmáticas de células LLC-MK₂ e K562, sendo que células K562 não são infectadas por *T. cruzi* nem aderem em superfícies recobertas com o peptídeo. Após solubilização e separação por SDS-PAGE, duas moléculas de massa molecular aproximada de 45 e 120 kDa foram detectadas somente no extrato de células LLC-MK₂ (figura 26). A marcação da proteína de 45 kDa foi específica e pode ser inibida por um excesso de 100 vezes de peptídeo J não marcado. Como esperado, não houve ligação de ¹²⁵I-peptídeo J em células K562, indicando que a molécula de 45 kDa presente na superfície de células LLC-MK₂ está envolvida no processo de adesão do

parasita à célula do hospedeiro vertebrado. Sendo assim, optou-se pela caracterização da molécula de 45 kDa.

FIGURA 26- Radiografia da separação por SDS-PAGE de membranas de células LLC-MK₂ (1 e 2) e K562 (3 e 4) ligadas covalentemente ao ¹²⁵I-peptídeo J, na presença (1 e 3) e ausência (2 e 4) de um excesso de 100 vezes de peptídeo J não radioativo. A seta indica a região de 45 kDa.

4.C.2. Purificação e Identificação do Ligante de 45 kDa

Células LLC-MK₂ foram biotiniladas e foi preparado um extrato de membrana, como descrito anteriormente. Esse extrato foi incubado com a coluna de J-Biomatriz, lavado com PBS e NaCl 1 M e a banda de 45 kDa foi eluída com uréia 8 M. Após separação por SDS-PAGE 9%, a região da banda de 45 kDa foi cortada e eletroeluída do gel por 5 horas com tampão Tris-glicina contendo SDS 0,1%. Esse material foi concentrado 20 vezes e aplicado novamente num gel de SDS-PAGE 9%. O resultado da

purificação pode ser analisado na figura 27. Essa molécula foi recortada do gel e enviada para o HHMI Biopolymer/Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory na Universidade de Yale (Estados Unidos) para determinação de sua sequência.

FIGURA 27- Gel de SDS-PAGE 9% ilustrando a purificação da molécula de 45 kDa. O gel foi corado com azul de coomassie. 1- extrato total de células; 2- eluato de uréia 8 M da coluna de J-Biomatriz; 3- molécula de 45 kDa purificada (seta).

A molécula de 45 kDa foi caracterizada como citoqueratina 18 biotinilada (CK18). CK18 é descrita como uma molécula que polimeriza com CK8 para formar o filamento intermediário, componente do citoesqueleto de epitélio simples e de vários neoplasmas derivados de epitélio. Embora esse tipo de citoqueratina não seja um contaminante comum de preparações, segundo a consultoria de Yale, para se eliminar a hipótese de contaminação externa, foram feitas diferentes tentativas de purificação do ligante do peptídeo J em fluxo laminar com a utilização de material esterilizado. Como controle foram utilizadas células K562, que expressam CK18 (Järvinen et al., 1990),

porém não são infectadas por *T. cruzi* (Ruiz et al., 1998) e não aderem ao peptídeo J como demonstrado. Além disso, as células foram biotiniladas, facilitando a caracterização dos ligantes de superfície. Desse modo, foram feitas duas novas colunas de afinidade ligando o peptídeo J em matriz sólida como anteriormente descrito, utilizando-se soluções autoclavadas e vidraria estéril durante todo o processo.

Por outro lado, CK18 interage fortemente com a parte interna da membrana plasmática, estando frequentemente presente em preparações de membrana (Hembrough et al., 1995). Sendo assim, células LLC-MK₂ e K562 foram biotiniladas e foi utilizado outro método de preparação de membrana celular, com tratamento alcalino da fração precipitada a 100.000 x g por 1 hora, seguido por outra centrifugação a 100.000 x g. Dados da literatura indicam que esse procedimento favorece o desprendimento de elementos do citoesqueleto aderidos à membrana (Christians et al., 1993). O pH de todas as frações foi ajustado para 7,4, o material foi solubilizado como descrito e a nova preparação com os devidos controles foram cromatografados na coluna de J-Biomatriz. Após lavagens com PBS, o material foi eluído com NaCl 1 M e uréia 8 M e analisado por SDS-PAGE. Como indicado na figura 28, não houve alteração do padrão de moléculas com afinidade pelo peptídeo J, detectando-se novamente a molécula de 45 kDa biotinilada (canaleta 7). Essa molécula foi extraída do gel e enviada para identificação no HHMI/Keck Facility Center em Yale – EUA. Os resultados novamente indicaram tratar-se de CK18.

Consistente com os resultados previamente obtidos, a figura 28 revela a existência de uma molécula de 45 kDa na superfície de células LLC-MK₂, ausente em células K562, com afinidade pelo peptídeo J. Essa molécula de 45 kDa foi recortada do gel, eletroeluída e novamente submetida a SDS-PAGE. A banda de 45 kDa foi recortada

do gel e enviada para caracterização em Yale, sendo novamente caracterizada como CK18.

FIGURA 28- Análise das frações do extrato de células LLC-MK₂ submetidas ao tratamento em pH alcalino, obtidas por cromatografia de afinidade em J-Biomatriz e separadas por SDS-PAGE. O gel foi corado com azul de coomassie. 1- extrato total de células; 2, 4, 6 e 8- eluatos com NaCl 1 M, das frações A, B, C e D (vide esquema da página 47); 3, 5, 7 e 9- eluatos com uréia 8 M. A seta indica a região de 45 kDa.

Com o intuito de avaliar se a molécula de 45 kDa com afinidade pelo peptídeo J pertence realmente a família das citoqueratinas, extratos de células LLC-MK₂ e K562 foram incubados separadamente com a coluna de J-Biomatriz. Os eluatos das colunas foram separados por SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. Essa membrana foi testada por Western blot com o anticorpo anti-PAN-cytokeratin (Sigma), como apresentado na figura 29, revelando que o anticorpo reconhece uma

banda única de células LLC-MK₂ presente na fração eluída de J-Biomatriz com uréia 8 M, mas ausente nas frações de células K562.

FIGURA 29- Análise das frações do extrato de células K562 (1-2) e LLC-MK₂ (3-4) obtidas por cromatografia de afinidade em J-Biomatriz por Western blot com anticorpo anti-PAN citoqueratina (1:200). 1 e 3- eluato com NaCl 1 M; 2 e 4- eluato com uréia 8 M.

4.C.3. Caracterização da Interação entre CK18 e o Peptídeo J

CK18 (Research Diagnostics) foi marcada com ¹²⁵I e cromatografada na coluna de J-Biomatriz. Como indicado na figura 30, ¹²⁵I-CK18 só foi eluída da coluna com uréia 8 M, corroborando os dados anteriores.

Para avaliar os efeitos de CK18 na adesão de células no peptídeo J, uma placa de 96 wells foi recoberta com o peptídeo e incubada com diferentes concentrações de CK18, seguida por incubação com células LLC-MK₂. A figura 31 mostra que CK18

inibe cerca de 60% a adesão de células ao peptídeo J na concentração de 0,01 μM , a menor concentração utilizada no experimento. Sendo assim, foi avaliada a afinidade de CK18 por formas infectivas, tripomastigotas, e não infectivas, epimastigotas, de *T. cruzi*. As células foram incubadas com ^{125}I -CK18 na presença e na ausência de um excesso molar de 100 vezes de CK18 não iodada, revelando que CK18 se liga de modo saturável em tripomastigotas, mas não em epimastigotas, como ilustrado na figura 32.

FIGURA 30- Análise das frações de ^{125}I -CK18 obtidas por cromatografia de afinidade em J-Biomatriz, separadas por SDS-PAGE e radiografadas. 1 -eluato total; 2- eluato com NaCl 1 M; 3- eluato com uréia 8 M. A seta indica a região de 45 kDa.

FIGURA 31- Adesão de células LLC-MK₂ em peços recobertos com o peptídeo J na presença de diferentes concentrações de CK18. Considerou-se 100% a adesão de células em peptídeo J na ausência de qualquer peptídeo em solução. Cada barra representa a média de determinações em triplicata.

FIGURA 32- Adesão de ¹²⁵I-CK18 em tripomastigotas (Ty) e epimastigotas (Epi) na presença (■) e ausência (■) de um excesso de 100 vezes de CK18 não radioativa. Cada barra representa representa a média ± SD de determinações em triplicata.

4.C.4. Localização de Citoqueratinas na superfície de células LLC-MK₂

Por imunofluorescência com anticorpo anti-PAN cytokeratin (Sigma), que reconhece as citoqueratinas 4, 5, 6, 8, 10, 13 e 18, foi possível avaliar se células LLC-MK₂ expressam citoqueratinas em sua superfície. Como ilustrado na figura 33, células LLC-MK₂ tripsinizadas, recuperadas, viáveis e não permeabilizadas expressam citoqueratinas em sua superfície de forma polarizada, quando aderidas ao peptídeo J ou em SFB. A localização polarizada é perdida quando a célula é permeabilizada com saponina antes da adição do anticorpo. Por outro lado, células K562 não apresentam citoqueratina na superfície, mas somente no citoplasma, quando a célula foi permeabilizada com 0,05% de saponina (figura 33).

4.C.5. Efeitos da Adesão do Peptídeo J em Células LLC-MK₂ via CK18

A fosforilação de CK18, de forma Ca^{2+} dependente, pode alterar a estrutura do citoesqueleto celular (Omary et al., 1998) e a desorganização dessa estrutura favorece a infecção pelo *T. cruzi* (Burleigh & Andrews, 1994). Com o intuito de avaliar o efeito da adesão de células ao peptídeo J sobre a arquitetura do citoesqueleto, lamínulas recobertas com o peptídeo J e com soro fetal foram incubadas com células LLC-MK₂. Após serem fixadas, as células foram permeabilizadas e testadas por imunofluorescência com faloidina (molécula com afinidade por filamentos de actina) ligada a rodamina. Como indicado na figura 34, o citoesqueleto de células aderidas em soro fetal apresenta um padrão de distribuição uniforme dos filamentos, enquanto que o

FIGURA 33- Imunofluorescência de células LLC-MK₂ (1-4) e K562 (5-6) com anticorpo anti-PAN-citoqueratina (Sigma). As células permeabilizadas ou não foram tratadas com anti-PAN-citoqueratina (1:200), seguida por incubação com anticorpo anti-camundongo conjugado a FITC. A- contraste de fase e B- imunofluorescência indireta. 1, 3 e 5- células viáveis e não permeabilizadas; 2, 4 e 6- células permeabilizadas com saponina 0,05%. LLC-MK₂ aderidas em poços forrados com o peptídeo J (1 e 2) ou SFB (3 e 4) e células K562 (5 e 6).

citoesqueleto de células aderidas no peptídeo J apresenta vários agrupamentos de filamentos em determinadas regiões da célula.

FIGURA 34- Imunofluorescência com faloidina ligada a rodamina de células LLC-MK₂ aderidas em soro fetal bovino (1-3) e no peptídeo J (4-6).

Deste modo, é provável que a adesão do peptídeo J em células LLC-MK₂ via CK18 altere a estrutura do citoesqueleto celular e favoreça a infecção pelo parasita. Ao se avaliar os efeitos do peptídeo J e pf-Tc85-12 no processo de invasão por tripomastigotas, as células foram incubadas com 10 μ M do peptídeo J, 1 μ M de pf-Tc85-12 e anticorpo anti-PAN-cytokeratin (1:200) e infectadas por 1 hora como descrito em material e métodos. Esse material foi corado, fotografado e o número de células infectadas e de parasitas por células foi determinado (tabela 3). De fato, os dados indicam que peptídeo J ou pf-Tc85-12 em solução aumentam a invasão de células LLC-MK₂ por *T. cruzi*, enquanto que o anticorpo anti-citoqueratina inibe a infecção.

A pf-Tc85-12 aumenta a invasão de células por *T. cruzi* em 15%. Embora esse aumento não seja muito grande, é significativo ($p < 0,05$). Além disso, a concentração de pf-Tc85-12 utilizada foi pequena (1 μ M), devido à baixa solubilidade da molécula. Corroborando esses dados, o peptídeo J, em concentração dez vezes maior, aumenta a infecção em 20,3%. Como esperado, quando o sítio de ligação do peptídeo J em células LLC-MK₂ é bloqueado por anticorpo anti-citoqueratina, a o número de células infectadas diminui em 15,7%. O número de tripanossomos por célula é de aproximadamente 15 em todas as amostras. Portanto, estes peptídeos parecem não interferir no número de tripomastigotas que invadem cada célula. Os dados apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) entre o número de células infectadas no experimento controle, na presença de J, pf-Tc85-12 e anticorpo anti-CK (figura 35). A tabela 3 apresenta o total de células contadas em cada amostra e os resultados estatísticos estão resumidos no gráfico da figura 35.

A

Fotos	% Células Infectadas				Número total de Células			
n°	Controle	Pf-Tc85-12	Pep J	Anti-CK	Controle	pf-Tc85-12	Pep J	Anti-CK
1	45,5	51,1	66,8	28,4	132	188	208	151
2	42,0	50,6	56,4	17,7	138	176	202	157
3	39,1	43,5	53,6	27,0	174	184	192	151
4	33,7	58,1	42,4	18,0	202	203	209	142
5	42,9	58,0	67,3	20,8	224	174	159	198
6	44,4	52,2	64,4	24,6	243	157	177	119
7	25,7	67,4	62,2	30,2	202	187	196	132
8	41,5	58,7	64,2	31,4	193	196	212	127
9	38,5	39,5	61,6	15,4	130	157	151	185
10	37,9	62,7	54,7	20,3	261	185	164	228
Total	743	1.013	1.110	371	1.899	1.807	1.870	1.590

B

Moléculas	0	pf-Tc85-12	Peptídeo J	Anti-CK
% Total de células infectadas	39,1 $\pm$ 5,8	54,2 $\pm$ 8,5	59,4 $\pm$ 7,7	23,4 $\pm$ 5,7

TABELA 3- Infecção de células LLC-MK₂ por tripomastigotas na presença de 10 μ M do peptídeo J, 1 μ M de pf-Tc85-12 e anticorpo anti-PAN-citoqueratina (1:200). A- porcentagem de células infectadas, não infectadas e número total de células; B- estatística dos dados da tabela A.

FIGURA 35- Importância da pf-Tc85-12, peptídeo J e CK18 na infecção de células LLC-MK₂ por formas tripomastigotas. As barras representam a média percentual de células infectadas num total de 500 células analisadas $\pm$ S.D. Os dados foram analisados pelo teste T de Student não pareado e $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

O *Trypanosoma cruzi* invade células não fagocíticas de modo dependente de energia (Schenkman et al., 1991) por um mecanismo distinto da fagocitose. A invasão ocorre após a adesão do parasita à célula hospedeira, envolvendo moléculas de superfície de ambas as partes. Nosso laboratório descreveu uma família de glicoproteínas de 85 kDa (Tc-85) presente na superfície de formas infectivas de *Trypanosoma cruzi* (Katzin & Colli, 1983; Andrews et al., 1984 e Zingales et al., 1982) e um anticorpo monoclonal contra essa família, que inibe parcialmente a entrada do parasita em células de mamíferos (Alves et al., 1986). Esses dados sugerem o envolvimento da Tc-85 na adesão do parasita às células hospedeiras. A clonagem de um membro dessa família (Tc85-11) revelou sua capacidade de adesão a células de mamíferos e a laminina (Giordano et al., 1994 e 1999). Outros laboratórios também implicaram moléculas de aproximadamente 85 kDa na interação do parasita com a célula do hospedeiro (Boschetti et al., 1987; Lima et al., 1989; Ramirez et al., 1993 e Araguth et al., 1988) incluindo uma proteína de 85 kDa, provavelmente da mesma superfamília, mas diferente da Tc85-11, descrita como receptor de fibronectina (Ouaissi et al., 1986). Anticorpos contra moléculas de mesma massa molecular inibiram a interação do parasita (Araguth et al., 1988).

A família da Tc-85 pertence à superfamília gênica das gp85/trans-sialidases, descrita posteriormente, da qual vários membros também foram implicados na interação do parasita com a célula hospedeira (Boschetti et al., 1987; Lima & Villalta, 1989, Ramirez et al., 1993 e Frasch, 2000). A superfamília gênica das gp85/trans-

sialidases é composta por mais de 1000 genes de aproximadamente 2-2,5 kb, representando pelo menos 1% do genoma de *T. cruzi* (Frasch et al., 2000). Os membros dessa família apresentam diferente grau de similaridade e podem ser simultaneamente expressos (Kahn et al., 1990). É interessante notar, que a meia vida de membros da família da Tc-85 é curta, de aproximadamente 3,5 hs (Abuin et al., 1996). Esse rápido turnover poderia facilitar a progressão do parasita dos vasos sangüíneos para as células, quando membros da família aderissem em diferentes ligantes da superfície celular, matriz extracelular e lâmina basal. Nossa hipótese de trabalho é a de que a família gênica das gp85/trans-sialidases codifica moléculas de adesão com epitopos específicos para diferentes ligantes, o que possibilitaria a interação do parasita com uma grande diversidade de células do hospedeiro vertebrado.

O trabalho descrito nesta tese teve como objetivo caracterizar possíveis receptores para membros da família da Tc-85 presentes na superfície de células de mamíferos. Desse modo, após a incubação de extrato de tripomastigotas com células LLC-MK₂, foi possível observar que as principais moléculas do parasita que aderem nessas células têm massa molecular de aproximadamente 85 kDa. Além disso, parte dessas moléculas são reconhecidas pelo anticorpo monoclonal H1A10, que define a família da Tc-85.

A partir dos resultados preliminares obtidos, foi possível observar, por diferentes técnicas, que o fragmento de 101 aminoácidos localizado na região carboxila terminal do clone Tc-85.11 (pf-Tc85-1) tem afinidade por componentes da célula hospedeira de diferentes massas moleculares, entre os quais laminina e uma molécula de 45 kDa. Foram feitas diferentes tentativas, sem sucesso, de se purificar essa molécula de 45 kDa. Sendo assim, para se restringir o número de ligantes para pf-Tc85-1 e definir seu

motivo de adesão em células de mamífero, 11 peptídeos correspondendo à região codificada por esse clone foram sintetizados.

Desse modo, foi possível identificar o peptídeo J, que contém o motivo mais conservado dos membros da superfamília gênica das gp85/trans-sialidases, como o sítio de ligação para células de mamíferos de diferentes linhagens. Após alteração da sequência de J por varredura com alanina (“alanine scanning”), concluiu-se que os aminoácidos mais importantes para adesão do peptídeo J em células de mamíferos (TxVFLYxR) são exatamente os mais conservados em todos os membros da superfamília gênica das gp85/trans-sialidases cujas sequências foram depositadas em bancos de dados.

A grande quantidade de informação nuclear que o parasita acumulou ao longo da evolução para manter sequências genômicas altamente similares sugere a importância da superfamília das gp85/trans-sialidases na sobrevivência da espécie. Além disso, o fato da sequência mais conservada entre os membros dessa família, ser um sítio de adesão do *T. cruzi* em células do hospedeiro vertebrado confirma a importância, durante a infecção, dos membros dessa família de glicoproteínas.

A partir desses resultados, tentamos caracterizar o ligante para o peptídeo J em células LLC-MK₂. Sabe-se que, durante o processo de infecção ocorre mobilização de íons Ca²⁺ tanto por parte do parasita quanto por parte da célula hospedeira (Burleigh & Andrews, 1998 e Yoshida et al., 2000). Além disso, membros da superfamília das gp85/trans-sialidases aderem em laminina e fibronectina. Sendo assim, foi avaliada a importância de íons Ca²⁺, moléculas da matriz extracelular e seus conhecidos receptores, integrinas, na adesão celular ao peptídeo J.

Trombospondina, depleção de íons Ca^{2+} e o bloqueio de integrinas $\alpha_5\beta_1$ e β_2 inibem, como mostrado, a adesão celular ao peptídeo J. Integrinas β_3 são descritas como receptores de trombospondina, porém, integrinas não parecem ser os receptores diretos do peptídeo, uma vez que este não compete com fibronectina, nem com RGD pela adesão em células. Além disso, extratos de células LLC-MK₂ eluídos de J-Biomatriz não são reconhecidos, por Western blot ou imunoprecipitação, pelos anticorpos anti-integrinas. Sendo assim, a ligação do peptídeo J ao seu receptor em células de mamífero pode ser dependente de integrinas ou modulada por integrinas.

Para testar a hipótese acima, sabendo-se que o principal ligante para o fragmento Tc85-1 tem 45 kDa e que a adesão celular em J é inibida por trombospondina, utilizamos anticorpos contra um receptor de trombospondina, IAP (integrin associated protein), que tem massa molecular de 50 kDa. IAP, também denominada CD47, está associada a integrinas e atua modulando a afinidade de integrinas por outros ligantes, além de regular o fluxo de Ca^{2+} através de membranas celulares (Porter & Hogg, 1998). O anticorpo anti-CD-47 não inibiu a adesão de células ao peptídeo J, porém aumentou-a em 50%. Esses resultados embora reforcem a hipótese de que a ativação de integrinas e a sinalização por íons Ca^{2+} estejam envolvidas no processo de adesão, são complexos, o que nos levou a mudar um pouco o enfoque experimental.

Com o intuito de se caracterizar o receptor do peptídeo J em células LLC-MK₂, extrato de células foram cromatografados em uma coluna de J-Biomatriz. Os extratos de células foram preparados de acordo com Pytella et al., 1987 e Brown et al., 1990, que utilizaram essa metodologia para a purificação de integrinas e moléculas associadas. No nosso caso, as principais moléculas eluídas foram caracterizadas como

CK18, vimentina e tubulina, sendo que, apenas CK18 está exposta na superfície da célula. Essas moléculas foram identificadas por digestão trípica no HHMI Biopolymer/Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory na Universidade de Yale – EUA por duas vezes em preparações independentes. CK18 não é um contaminante comum de amostras, uma vez que não faz parte das camadas superiores queratinizadas da derme (Bosch et al., 1988). Além disso, o pI determinado para a molécula de 45 kDa (5,2) por eletroforese bidimensional do eluato com uréia 8 M da coluna de pf-Tc85-1-Sepharose é o mesmo da CK18 nativa (Moll et al., 1982).

CK18 é uma proteína do filamento intermediário que associa-se com CK8 para formar um componente do citoesqueleto em epitélio simples e em muitos epitélios derivados de neoplasmas. A CK18 pode ser expressa aberrantemente em células cancerígenas não epiteliais, incluindo linfomas, melanomas, gliomas e sarcomas e em diversos casos sua elevada expressão foi correlacionada com o aumento da invasividade celular *in vitro* e *in vivo* (Hembrough et al., 1995).

Nos últimos anos, foi demonstrado que citoqueratinas e outras proteínas intracelulares não são exclusivas do citossol. Vários estudos mostraram que proteínas intracelulares também são expressas na superfície das células e funcionam como receptores para diferentes ligantes plasmáticos e bactérias. Por exemplo, por imunofluorescência, alfa actina foi detectada na superfície de células endoteliais de pulmão de cabras e humanos e foi descrita com ligante de Fator Va, angiogenina, plasminogênio e lipoproteína a (Moroianu et al., 1993 e Wells et al., 1997).

Quanto às citoqueratinas, CK1 foi descrita como possível ligante e receptor de apresentação de cininogênio (Hasan et al., 1998); CK13, presente na superfície de células epiteliais da boca, é ligante de *Burkholderia cepacia* (Sajian et al., 2000); CK 8

é receptor de plasminogênio em hepatócitos e em células de câncer de mama (Hembrough et al., 1996a e 1996b), além de ter sido descrito na superfície de células epiteliais como ligante para Streptococci do grupo b e outros cocci gram positivos (Tamura et al., 2000). De interesse imediato para o nosso trabalho, CK 18 é receptor para complexos de trombina-antitrombina III presentes na superfície de hepatócitos de coelho (Hembrough et al., 1996a e 1996b).

CK18 não tem domínio transmembrânico. Desse modo, especula-se que sua apresentação na superfície celular possa ocorrer devido à projeção de CK18 através da membrana plasmática, como parte de um complexo protéico. Outra hipótese, é a de que CK18 secretada pelas células possa se associar com a membrana plasmática (Riopel et al., 1993), pois já foi demonstrado que CK18 liga-se covalentemente a lipídios (Asch et al., 1993). Esses conjugados covalentes podem translocar CK18 para a membrana externa durante o “shedding” normal da membrana (Hembrough et al., 1995).

Fibras de citoqueratina estão morfologicamente associadas à membrana plasmática por hemidesmosmosos (HD), que são junções celulares que ancoram células epiteliais a matriz extracelular (Fontao et al., 1999). Entre os componentes moleculares dos HD estão as plectinas, que ligam os filamentos de citoqueratina aos HD, proteínas trans-membrânicas e integrinas $\alpha 6 \beta 4$, que são receptores de laminina (Reznicek, et al., 1998). É interessante lembrar que, nosso laboratório descreveu que membros da Tc85 ligam em laminina (Giordano et al., 1999), em células de mamífero via CK18 e os dados aqui apresentados sugerem o envolvimento de integrinas no processo de adesão, porém a conexão entre essas informações ainda não foi estabelecida.

Sabe-se que a mobilização de integrinas $\alpha 6 \beta 4$ de hemidesmosmosos e sua associação com protusões celulares ricas em actina dirigem a migração quimiotática de

células cancerígenas (Rabinovitz et al., 1999). Procópio et al. (1999) demonstraram a formação de protusões de actina durante a invasão de células de cultura por formas infectivas de *T. cruzi*. Resta saber se citoqueratinas estão envolvidas nesse processo. Procópio et al. (1999) também salientam que dependendo do estágio de desenvolvimento do parasita e da célula hospedeira, o processo de invasão apresenta ou não formação de protusões de actina.

Além da CK18 ser expressa em várias células transformadas, células normais, não epiteliais, também expressam CK18, como é o caso do endotélio de veias e capilares do sistema linfático; da pele; de tecidos subcutâneos lisos; de músculo esquelético; de músculo liso de placenta e mucosas (Miettinen et al., 2000).

A infecção primária de *T. cruzi* em humanos ocorre naturalmente através da lesão da pele causada pela picada do inseto, quando há o contato direto de fezes contaminadas com a camada da derme ou com tecidos epiteliais e endoteliais. A presença de CK18 em mucosas, células epiteliais e no endotélio de veias e capilares de placenta (Miettinen et al., 2000), sugere que sua interação com membros da superfamília das gp85/trans-sialidases pode auxiliar o parasita a atravessar a mucosa do olho e placenta. Essa interação deve contribuir para o aparecimento do sinal de Romaña e para explicar a transmissão congênita da doença de Chagas.

É interessante notar que, a caracterização de CK18 como um ligante de Tc85-1 explica em parte os resultados preliminares obtidos nas tentativas de purificar a molécula de 45 kDa por cromatografia de afinidade em pf-Tc85-1-Sepharose. CK18 é muito pouco solúvel (Steinert & Roop, 1988 e Tamura et al., 2000) e o detergente utilizado (NP-40) tanto na preparação de extrato celular, como na eluição da coluna não

era adequado, levando a baixo rendimento em todas as tentativas feitas de purificação da molécula.

Por outro lado, tubulina que pode ser eluída da coluna de pf-Tc85-1-Sepharose também foi eluída da coluna de J-Biomatriz. Tubulina e vimentina também fazem parte de fibras que compõem o citoesqueleto, mas não são apresentadas na superfície de células LLC-MK₂. Resta saber se essas moléculas realmente se ligam ao peptídeo J ou se são eluídas de J-Biomatriz por estarem fortemente associadas às fibras de CK18, como indicado na figura 36 (Herrmann & Aebi, 2000).

FIGURA 36- Representação esquemática da interação entre microfilamentos (MF), microtúbulos (MT) e filamento intermediário (IF) envolvendo plectina e seu domínio de ligação em actina (ABD) e em microtúbulos (MBD).

Os dados aqui apresentados também corroboram publicações anteriores de nosso laboratório. O fragmento Tc85-1 liga-se em laminina (Giordano et al., 1999) e em células de mamífero via peptídeo J, como demonstrado. O mAb H1A10 inibe a invasão de células pelo *T. cruzi* (Alves et al., 1986), provavelmente por impedimento estérico, uma vez que o epitopo de mAb H1A10 está contido no peptídeo G, que está separado do peptídeo J por 20 aminoácidos.

Dados da literatura indicam que, a transdução de sinal via proteína G é necessária para a invasão de células pelo *T. cruzi* (Tardieux, et al., 1994; Scharfstein, et al., 2000 e DoCampo, et al., 1999). A caracterização de um agonista de $[Ca^{2+}]_i$ desconhecido sugere uma função para uma serino-protease citossólica de 80 kDa do parasita (Burleigh et al., 1997) como a geradora de atividade agonista. Cruzipaína, a principal protease de parasita, também implicada na invasão (Meirelles et al., 1992) tem atividade de cininogenase (Del Nery et al., 1997). Recentemente, foi demonstrado que a capacidade de invasão do parasita está relacionada com a atividade de liberação de cinina por cruzipaína, proposta como fator de virulência na doença de Chagas (Scharfstein et al., 2000). É interessante notar, que citoqueratinas vêm sendo descritas na literatura como ligantes e receptores para apresentação de proteases: CK1 liga cininogênio (Hasan et al., 1998), CK 8 é receptor de plasminogênio (Hembrough et al., 1996a e 1996b) e CK 18 é receptor para complexos de trombina-antitrombina III (Hembrough et al., 1996a e 1996b).

A internação de *T. cruzi* requer recrutamento de lisossomos, induzindo agrupamento localizado e fusão de lisossomos com a membrana plasmática da célula no sítio de adesão de tripomastigotas. Esse processo necessita de pulsos $[Ca^{2+}]_i$ da célula hospedeira e rearranjo de microfilamentos de actina, que pode facilitar o acesso dos

lisossomos à membrana plasmática durante o processo de invasão pelo parasita (Burleigh & Andrews, 1998). Os filamentos que compõem o citoesqueleto da célula estão interconectados aos microfilamentos de actina (figura 36), sendo que o colapso das fibras de actina também envolve a desorganização de fibras do filamento intermediário (citoqueratinas) (Correia et al., 1999 e Prahlad et al., 1998). Sendo assim, é possível que a adesão do parasita a CK18 também possa influenciar o processo de migração de lisossomos. Além disso, complexos de trombina-anti-trombina, que são internalizados via CK18 na superfície de hepatócitos são enviados para degradação em lisossomos (Wells et al., 1997).

A pré-incubação de células LLC-MK₂ com o peptídeo J e com pf-Tc85-12 aumenta a invasão celular, sugerindo que membros da superfamília das gp85/transsialidases sejam moléculas de sinalização que facilitam a infecção de células do hospedeiro vertebrado pelo *T. cruzi*. Sabe-se que membros da família da Tc-85 são liberados no meio de cultura pelo parasita em vesículas de membrana plasmática (Gonçalves et al., 1991 e Abuin et al., 1996). Portanto, podemos sugerir que essas moléculas livres ou presentes na superfície do *T. cruzi* promovem alterações na célula hospedeira que facilitam a infecção.

CK18 pode ser fosforilada por proteína quinase C (Omary et al., 1992) e proteínas 14-3-3 durante a progressão do ciclo celular (Liao & Omary, 1996). Sendo que estas interagem com diversas quinases envolvidas na transdução de sinal (Aitken, 1995). A fosforilação de CK18 aumenta sua solubilidade e altera a arquitetura do citoesqueleto celular (Ku & Omary, 1998b). Desse modo, a interação do motivo VTxVFLYxR com CK18 poderia levar à fosforilação ou desfosforilação de CK18 e subsequente alteração do citoesqueleto, favorecendo a invasão.

A presença de anticorpos anti-citoqueratina no meio de cultura inibe a infecção em 15%, porém o anticorpo comercial utilizado não é específico contra CK18, reconhecendo outras citoqueratinas e, por motivos técnicos, não foi possível seu uso em concentrações maiores. Essa baixa inibição pode ser devida ainda a outros fatores. Membros da família das gp 85/trans-sialidases contêm outros sítios de adesão a células, cujos receptores ainda não foram caracterizados e que também podem ser importantes durante o processo de infecção (Giordano et al., 1999 e Ruiz et al., 1998). Além disso, nem todas as células expressam ou expõem citoqueratinas na superfície (figura 33). Já foi demonstrado por diferentes autores que dependendo da linhagem e do estágio de desenvolvimento do parasita e da célula hospedeira, o mecanismo de invasão parece ser diferente (Procópio et al., 1999 e Burleigh & Andrews 1995).

Na verdade, a adesão da sequência VTxVFLYxR a CK18 pode ter várias funções durante os diferentes estágios da parasitemia, primeiramente facilitando a entrada do parasita por descontinuidades da pele ou mucosas. Uma vez na circulação do hospedeiro, a interação VTxFLYxR-CK18 poderia ancorar o parasita em células endoteliais e ao entrar nas células, essa interação pode favorecer a estabilização do parasita no meio intracelular, ligando-o às fibras do citoesqueleto. A interação de microorganismos intracelulares com fibras do citoesqueleto já foi descrita por diferentes autores (Dramsi & Cossart, 1998; Finlay & Cossart, 1997 e Finlay & Ruschkowski, 1991).

Outros investigadores mostraram que receptores de TGF- β são necessários para a invasão de células de mamífero por *T. cruzi* (Ming et al., 1995) e que células tratadas com EGF + TGF- β apresentam altos níveis de CK18 (Sánchez et al., 1998). Além disso, hepatócitos cultivados em placas forradas com fibronectina também apresentam altos

níveis de CK18 (Sanchez et al., 2000). É interessante notar que, Ouaisi et al. (1985) observaram que a presença de fibronectina no meio de cultura aumenta a invasão de células pelo *T. cruzi*. A especulação de que diferentes condições fisiológicas levam a um aumento de CK18 na superfície e portanto a um aumento de infecção é tentadora. No entanto, vários desses fatores podem estar alterando a sobrevivência intracelular do parasita (Scharfstein, 2000; Freire de Lima et al., 2000 e Huang et al., 1999). De qualquer modo, a infecção pelo *T. cruzi* é um complexo processo que envolve diferentes ligantes e receptores tanto do parasita quanto da célula do hospedeiro vertebrado.

Em resumo, os resultados aqui apresentados favorecem a hipótese de que membros da família da gp85/transialidase são moléculas multiadesivas e que o domínio mais conservado é um importante sítio de adesão do parasita na superfície de células de mamíferos, embora outros sítios de adesão não possam ser eliminados (Giordano et al., 1999 e Ruiz et al., 1998). De acordo com as recentes evidências de expressão de proteínas intracelulares na superfície de células e a expressão de citoqueratinas em tecidos não epiteliais, nossos dados indicam que CK18 é um possível receptor ou ativador de receptor necessário para a adesão de *T. cruzi* as células de mamíferos.

CONCLUSÃO

A partir dos dados aqui apresentados, podemos concluir que:

- O domínio mais conservado da família das gp85/transialidases (VTxVFLYxR) é um importante sítio de adesão do parasita na superfície de células de mamíferos, embora outros sítios de adesão existam (Giordano et al., 1999 e Ruiz et al., 1998);
- O receptor na superfície de células epiteliais para esse domínio é CK18;
- A família da Tc-85 é composta por moléculas multiadesivas. Um membro dessa família liga-se a pelo menos duas moléculas diferentes: laminina e CK18.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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., Couto, A.S., Lederkremer, R.M., Casal, O.L., Galli, C., Colli, W. & Alves, M.J.M. (1996). *Trypanosoma cruzi*: the Tc-85 surface glycoprotein shed by trypomastigotes bears a modified glycosylphosphatidylinositol anchor. *Exp. Parasitol.* **82**, 290-7.
- 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.
- Aitken, A., Jones, D., Soneji, Y. & Howell, S. (1995). 14-3-3 proteins: biological function and domain structure. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 605-11.
- Alberts, B. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (3rd edn), Garland Publishing.

- Alves, M.J.M., Abuin, G., Kuwijima, V.J. & Colli, W. (1986). Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **21**, 75-82.
- Andrews N.W. & Colli, W. (1982). Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* **14**, 447-51.
- Andrews, N.W., Katzin, A.M. & Colli, W. (1984). Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by 2D electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. *Eur. J. Biochem.* **140**, 599-604.
- Araguth, M.F., Rodrigues, M.M. & Yoshida, N. (1988). *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes: neutralization by the stage-specific monoclonal antibody 1G7 and immunogenicity of 90 kD surface antigen. *Parasite Immunol.* **10**, 707-12.
- Arruda, M.V., Colli, W. & Zingales, B. (1989). Terminal β -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **182**, 413-21.
- Asch, H.L., Mayhew, E., Lazo, R.O. & Asch, B.B. (1993). Lipids covalently bound to keratins of mouse mammary epithelial cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **29**, 1161-9.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1989). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. New York USA.
- Barbosa Jr, A.A. & Andrade, Z.A. (1984). Identificação do *Trypanosoma cruzi* nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. *Rev. Soc. Braz. Med. Trop.* **17**, 123-126.
- Baribault H, Oshima RG. (1991). Polarized and functional epithelia can form after the targeted inactivation of both mouse keratin 8 alleles. *J Cell Biol.* **115**, 1675-84.
- Bosworth, N. & Towers, P. (1989). Scintillation proximity assay. *Nature* **341**, 167-168.
- Bosch, F.X., Leube, R.E., Achtstatter, T., Moll, R. & Franke, W.W. (1988). Expression of simple epithelial type cytokeratins in stratified epithelia as detected by immunolocalization and hybridization in situ. *J Cell Biol.* **106**, 1635-48.
- Boschetti, M.A., Piras, M.M., Henriques, D. & Piras, R. (1987). The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**, 175-184.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-54.

- 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 epimastigote 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. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 175-200.
- Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P. & Andrews, N.W. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca^{2+} -signaling in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **136**, 609-20.
- 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.

- Buscaglia, C.A., Alfonso, J., Campetella, O. & Frasch, A.C. (1999). Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. *Blood* **93**, 2025-32.
- 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., Andrade, A.C., Almeida, I.C., Travassos, L.R. & Gazzinelli, R.T. (1997b). Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J. Immunol.* **159**, 6131-9.
- Caulin, C., Ware, C.F., Magin, T.M. & Oshima, R.G. (2000). Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J. Cell. Biol.* **149**:17-22.
- 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.

- Christians, S., Neubauer, K.H. & Ulrich, H. (1993). Purification and characterization of the head-activator receptor from a multi-headed mutant of *Chlorohydra viridissima*. *FEBS Lett.* **316**, 141-6.
- Chu, Y-W., Runyan, R.B., Oshima, R.G. & Hendrix, M.J.C. (1993). Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 4261-25.
- Colli, W. (1993). Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* **7**, 1257-64.
- Correia, I., Chu, D., Chou, Y.H., Goldman, R.D. & Matsudaira, P. (1999). Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. *J. Cell Biol.* **146**, 831-42.
- Coulombe, P.A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S. & Wirtz, D. (2000). The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol.* **10**, 420-8.
- Couto, A.S., Katzin, A.M., Colli, W. & Lederkremer, R.M. (1987). Sialic acid in a complex oligosaccharide chain of the Tc-85 surface glycoprotein from the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**, 145-154.
- Couto, A.S., Gonçalves, M.F., Colli, W. & Lederkremer, R.M. (1989). The N-linked carbohydrate chain of the 85 kDa glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* contains

- sialyl, fucosyl and galactosyl (α 1-3) galactose units. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**, 101-108.
- Couto, A.S., Lederkremer, R.M., Colli, W. & Alves, M.J.M. (1993). The glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypomastigote-specific Tc-85 glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. Metabolic labeling and structural studies. *Eur. J. Biochem.* **217**, 597-602.
- Cremona, M.L., Sanchez, D.O., Frasch, A.C. & Campetella O. (1995). A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. *Gene* **160**, 123-8.
- 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.
- 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.

- Del Nery, E., Juliano, M.A., Lima, A.P., Scharfstein, J. & Juliano, L. (1997) Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **272**, 25713-8.
- DoCampo R., Moreno, S.N. & Vercesi, A.E. (1993). Effect of thapsigargin on calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**, 305-13.
- DoCampo, R. and Moreno, S.N.J. (1999). Acidocalcisome: A Novel Ca²⁺ Storage Compartment in Trypanosomatids and Apicomplexan Parasites. *Parasitology Today*, **15**, 443-448.
- Drams, S. & Cossart, P. (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 137-66.
- Favoreto, S. Jr, Dorta, M.L. & Yoshida, N. (1998). *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Exp Parasitol.* **89**, 188-94.
- 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.

- Finlay, B.B., Ruschkowski, S., Dedhar, S. (1991). Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. *J Cell Sci.* **99**, 283-96.
- Finlay, B.B. & Cossart, P. (1997). Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* **276**, 718-25.
- Fontao, L., Stutzmann, J., Gendry, P. & Launay, J.F. (1999). Regulation of the type II hemidesmosomal plaque assembly in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res.* **250**, 298-312.
- 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.
- Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B.P., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., DeMello, F.G., DosReis, G.A. & Lopes, M.F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* **403**, 199-203.
- Frasch, A.C. (2000). Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* **16**, 282-6.
- Franchin, G., Pereira-Chiocola, V.L., Schenkman, S. & Rodrigues M.M. (1997). Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent

- epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infect. Immun.* **65**, 2548-54.
- Fuchs, E. & Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* **63**, 345-82.
- Fuchs, E. & Cleveland, D.W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-9.
- Gillard, B.K., Clement, R., Colucci-Guyon, E., Babinet, C., Schwarzmann, G., Taki, T., Kasama, T. & Marcus, D.M. (1998). Decreased synthesis of glycosphingolipids in cells lacking vimentin intermediate filaments. *Exp. Cell. Res.* **242**, 561-72.
- Giordano, R., Chammas, R., Veiga, S.S., Colli, W. & Alves, M.J.M. (1994). An acidic component of the heterogenous 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 a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J. Biol. Chem.* **274**, 3461-68.

- Gonçalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., de Souza, W., Alves, M.J.M., Zingales, B. & Colli, W. (1991). *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72, 43-53.
- Grant, G.A. (1992). *Synthetic peptides: A user's guide*. H. Freeman and Company, New York.
- Hall, B.S. & Pereira, M.A. (2000). Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect. Immun.* 68: 2077-81.
- Hall, B.F. (1993). *Trypanosoma cruzi*: mechanisms for entry into host cells. *Semin Cell Biol.* 4, 323-33.
- Hasan, A. A. K., Zisman, T. & Schmaier, A. H. (1998). Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3615-20.
- Heath, J.P. & Holifield, B.F. (1991). Cell locomotion. Actin alone in lamellipodia. *Nature* 352, 107-8.
- Hembrough, T.A., Vasudevan, J., Allietta, M.M., Glass II, W.F. & Gonias, S.L. (1995). A cytokeratin 8-like protein with plasminogen-binding activity is present on the

external surfaces of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. *J. Cell Sci.* **108**, 1071-82.

Hembrough, T. A., Li, L. & Gonias, S. L. (1996a). Cell surface cytokeratin 8 is the major plasminogen receptor on breast cancer cells and is required for the accelerated activation of cell-associated plasminogen by tissue type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* **271**, 25684-91.

Hembrough, T. A., Kralovich, K. R., Li, L. & Gonias, S. L. (1996b). Cytokeratin 8 released by breast carcinoma cells in vitro binds plasminogen and tissue-type plasminogen activator and promotes plasminogen activation. *Biochem. J.* **317**, 763-9.

Herrmann, H. & Aebi, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 79-90.

Huang, H., Calderon, T. M., Berman, J. W., Braunstein, V. L., Weiss, L.M., Wittner, M. & Tanowitz, H. B. (1999). Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF- κ B and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect. Immun.* **67**, 5434-40.

Jackson, B.W., Grund, C., Schmid, E., Burki, K., Franke, W.W. & Illmensee, K. (1980). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate

filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos.

Differentiation. **17**, 161-79.

Järvinen, M., Andersson, L.C. & Virtanen, I. (1990). K562 erythroleukemia cells express cytokeratins 8, 18, and 19 and epithelial membrane antigen that disappear after induced differentiation. *J Cell Physiol*. **143**, 310-20.

Kahn, S., Van Voorhis, W.C. and Eisen, H. (1990). The major 85-kD surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. *J. Exp. Med.* **172**, 589-97.

Kahn, S.J. and Wleklinski, M. (1997). The surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* encode a superfamily of variant T cell epitopes. *J.Immunol.* **159**, 4444-51.

Katzin, A.M. & Colli, W. (1983). Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi* an N-acetyl-D-Glucosamine-containing glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochem. Biophys. Acta* **727**, 403-11.

Ku, N.O., Liao, J. & Omary MB. (1997). Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J. Biol. Chem.* **272**, 33197-203.

Ku, N.O., Michie, S.A., Soetikno, R.M., Resurreccion, E.Z., Broome, R.L. & Omary, M.B. (1998a). Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J. Cell. Biol.* **143**, 2023-32.

- Ku, N.O., Liao, J. & Omary, M.B. (1998b). Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J.* **17**, 1892-906.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-85.
- Lee, M.K. & Cleveland, D.W. (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 187-217.
- Leite, M. F., Moyer, M. S., Nathanson, M. H. & Andrews, N. W. (1998). Expression of the mammalian $[Ca^{2+}]_i$ response to the *Trypanosoma cruzi* signaling factor in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**, 1-13.
- Liao, J. & Omary, M.B. (1996) 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J. Cell Biol.* **133**, 345-57.
- Lima, M.F., & Villalta, F. (1989). *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**, 159-170.
- Meirelles, M.N., Juliano, L., Carmona, E., Silva, S.G., Costa, E.M., Murta, A.C. & Scharfstein, J. (1992). Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**, 175-84.

Miettinen, M. & Fetsch, J.F. (2000). Distribution of keratins in normal endothelial cells and a spectrum of vascular tumors: implications in tumor diagnosis. *Hum. Pathol.* **31**, 1062-7.

Ming, M., Ewen, M.E. and Pereira, M.E.A. (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF- β signaling pathway. *Cell* **82**, 287-96.

Moll, R., Franke, W.W. & Schiller, D.L. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11-24.

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

Moroianu, J., Fett, J. W., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. (1993). Actin is a surface component of calf pulmonary artery endothelial cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3815-3819.

Mortara, R.A. (1991). *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol.* **73**, 1-4.

Newham, P. & Humpries, M.J. (1996). Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine. *Mol Med Today* **2**, 304-13.

- Noisin, E.L. & Villalta, F. (1989). Fibronectin increases *Trypanosoma cruzi* amastigote binding to and uptake by murine macrophages and human monocytes. *Infect. Imm.* **57**, 1030-34.
- Nomizu, M., Kim, W.H., Yamamura, K., Utani, A., Song, S.Y., Otaka, A., Roller, P.P., Kleinman, H.K. & Yamada, Y. (1995). Identification of cell binding sites in the laminin alpha 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **270**, 20583-90.
- Norris, K.A. (1998). Stable transfection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes with the trypomastigote-specific complement regulatory protein cDNA confers complement resistance. *Infect. Immun.* **66**, 2460-5.
- O'Farrel, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-21.
- Omary, M.B., Baxter, G.T., Chou, C.F., Riopel, C.L., Lin, W.Y. & Strulovici, B. (1992). PKC epsilon-related kinase associates with and phosphorylates cytokeratin 8 and 18. *J. Cell Biol.* **117**, 583-93.
- Omary, M.B., Ku, N.O., Liao, J. & Price, D. (1998). Kreatin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell. Biochem.* **31**, 105-40.

- Ortega-Barria, E. & Pereira, M.E.A. (1991). A novel *Trypanosoma cruzi* heparin binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell* **67**, 411-21.
- Ortega-Barria, E. & Pereira, M.E.A. (1992). Entry of *Trypanosoma cruzi* into eucaryotic cells. *Infect. Agents Dis.* **1**, 136-45.
- Osborn, M., Altmannsberger, M., Debus, E. & Weber, K. (1985). Differentiation of the major human tumor groups using conventional and monoclonal antibodies specific for individual intermediate filament proteins. *Ann N Y Acad Sci.* **455**, 649-68.
- Ouaissi, M. A., Afchain, D., Capron, A. & Grimaud, J. A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature*, **308**, 380-2.
- Ouaissi, M.A., Cornette, J. & Capron, A. (1985). *Trypanosoma cruzi*: modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. *Eur. J. Immunol.* **15**, 1096-101.
- Ouaissi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Grass-Masse, H. & Tartar, A. (1986a). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science* **234**, 603-7.

- Ouaissi, M.A., Cornette, J. & Capron, A. (1986b). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**, 201-11.
- Ouaissi, M.A. (1988). Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitol. Today* **4**, 169-73.
- Ouaissi, M.A. & Capron, A. (1989). Some aspects of protozoan parasite-host cell interactions with special reference to RGD-mediated recognition process. *Microb. Pathog.* **6**, 1-5.
- Pasqualini, R., Koivunen, E. & Ruoslahti, E. (1996). Peptides in cell adhesion: powerful tools for the study of integrin-ligand interactions. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**, 1151-8.
- Porter, J.C. & Hogg, N. (1998). Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends Cell Biol.* **8**, 390-6.
- Prahlad, V., Yoon, M., Moir, R.D., Vale, R.D. & Goldman, R.D. (1998). Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filaments networks. *J. Cell Biol.* **143**, 159-170.

- Prioli, R.P., Mejia, J.S. & Pereira, M.E.A. (1990a). Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognise a subset of trypomastigotes, and enhance infection in vitro. *J. Immunol.* **144**, 4384-91.
- Prioli, R.P., Rosenberg, I. & Pereira, M.E.A. (1990b). High and low density lipoproteins enhance infection of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**, 191-198.
- Procópio, D. O., Barros, H. C., Mortara, R.A. (1999). Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 911-24.
- Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Argraves, S., Suzuki, S. & Ruoslahti, E. (1987) Arginine-Glycine-Aspartic Acid adhesion receptors. *Methods in Enzymol.* **144**, 475-489.
- Rabinovitz, I., Toker, A. & Mercurio, A.M. (1999). Protein kinase C-dependent mobilization of the $\alpha 6 \beta 4$ integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J. Cell. Biol.* **146**, 1147-60.
- Ramirez, M.I., Ruiz, R., Araya, J.E., Silveira, J.F. & Yoshida, N. (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect. Immun* **61**, 3636-41.

- Rezniczek, G.A., de Pereda, J.M., Reipert, S. & Wiche, G. (1998). Linking integrin alpha6beta4-based cell adhesion to the intermediate filament cytoskeleton: direct interaction between the beta4 subunit and plectin at multiple molecular sites. *J Cell Biol.* **141**, 209-25.
- Riopel, C.L., Butt, I., Omary, M.B. (1993). Method of cell handling affects leakiness of cell surface labeling and detection of intracellular keratins. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **26**, 77-87.
- Rodriguez, A., Webster, P., Ortego, J. & Andrews, N.W. (1997). Lysosomes behave as Ca^{2+} -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **137**, 93-104.
- Romaña, C. (1935). Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad.) *Public MEPR* **22**, 16-28.
- Rosenberg, I.A., Prioli, R.P., Mejia, J.S. e Pereira M.E. (1991). Differential expression of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase in intra- and extracellular trypomastigotes. *Infect. Immun.* **59**, 464-6.

Ruiz, R., Rigoni, V.L., Gonzalez, J. & Yoshida, N. (1993). The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasitol. Immunol.* **15**, 121-125.

Ruiz, R.C., Favoreto, S.Jr., Dorta, M.L., Oshiro, M.E.M., Ferreira, A.T., Manque, P.M. & Yoshida, N. (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca^{2+} signaling activity. *Biochem. J.* **330**, 505-511.

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

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez, A. et al. (1998). Transforming growth factor- β (TGF- β) and EGF promote cord-like structures that indicate terminal differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.* **242**, 27-37.

Sanchez, A. Alvarez, A.M., Pagan, R., Roncero, C., Vilaro, S., Benito, M. & Fabregat, I. (2000). Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J. Hepatol.* **32**, 242-50.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequence with chain terminator inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M.M., Lima, A.P., Morrot, A., Juliano, L. & Muller-Esterl, W. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J. Exp. Med.* 192, 1289-300.
- Schenkman, S., Andrews, N.W., Nussenzweig, V. & Robbins, E.S. (1988). *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell* 55, 157-165.
- Schenkman, S., Diaz, C. & Nussenzweig, V. (1991). Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* 72, 76-86.
- 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. and Nussenzweig, V. (1994). Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 499-523.

- Silva, L.H.P. & Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* **20**, 191-207.
- Souto-Padron, T., Harth, G. & de Souza W. (1990). Immunocytochemical localization of neuraminidase in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* **58**, 586-92.
- Steinert, P.M. & Roop, D.R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 593-625.
- Takahashi, K., Coulombe, P.A. & Miyachi, Y. (1999). Using transgenic models to study the pathogenesis of keratin-based inherited skin diseases. *J. Dermatol. Sci.* **21**, 73-95.
- Tamura, G.S. & Nittayajarn, A. (2000). Group B Streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. *Infect. Immun.* **68**, 2129-34.
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E. & Andrews, N.W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* **71**, 1117-30.
- Tardieux, I., Nathanson, M.H. & Andrews, N.W. (1994). Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free Ca^{2+} -transients. *J. Exp. Med.* **179**, 1017-22.

- Velge, P., Ouaisi, 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**, 255-268.
- Vieira, C.F.M., De Carvalho, T.U., Cunha, N.L. & De Souza, W. (1994). Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **203**, 967-71.
- Wells, M.J., Hatton, M.W., Hewlett, B., Podor, T.J., Sheffield, W.P. & Blajchman M.A. (1997). Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *J. Biol. Chem.* **272**, 28574-81.
- Yoshida, N. (1983). Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **40**, 836-9.
- Yoshida N., Araya, J.E., da Silveira, J.F. & Giorgio, S. (1993). *Trypanosoma cruzi*: antibody production and T cell response induced by stage-specific surface glycoproteins purified from metacyclic trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **77**, 405-13.
- Yoshida, N., Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro, M.E., Mortara, R.A., Acosta-Serrano, A. & Favoreto Junior, S. (1997). Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* **84**, 57-67.

Yoshida, N., Favoreto, S. Jr., Ferreira, A. T. & Manque, P. M. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 269-78.

Zingales, B., Andrews, N.W., Kuwajima, V.Y. and Colli, W. (1982). Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **6**, 111-124.