

MODULAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE *Trypanosoma cruzi* : LIGAÇÃO,  
ENDOCITOSE E SHEDDING DE RECEPTORES

PAULA LOBÃO ANTUNES DE SIQUEIRA TORRES



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Thaïs Souto-Padrón

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

Outubro de 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Torres, Paula Lobão Antunes de Siqueira

Modulação da superfície de *Trypanosoma cruzi*: ligação, endocitose e shedding de receptores/ Paula Lobão Antunes de Siqueira Torres.- Rio de Janeiro: UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2006.

X,111

Orientador: Thaïs Souto-Padrón

Tese (Doutorado) – UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/ Doutorado em Ciências (Microbiologia), 2006.

Referência bibliográficas: f.130

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Endocitose 3. Shedding 4. Receptores de IgG 5. Citometria de fluxo 6. Microscopia eletrônica I. Souto-Padrón, Thaïs. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia). III. Modulação da superfície de *Trypanosoma cruzi*: endocitose e shedding de receptores.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura , Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Profa. Thaïs Souto-Padrón.

## *Agradecimentos*

À Thaïs pela orientação e, sobretudo, pela compreensão principalmente nos momentos mais difíceis da finalização deste trabalho.

Aos professores do Instituto de Microbiologia sempre amigos e solidários durante todo meu desenvolvimento nesta casa. Agnes Figueiredo, Armando Borges, Ângela Gonçalves, Sérgio Fracallanza, obrigada especialmente à vocês.

À Dani e Rachel que se tornaram muito mais que companheiras de trabalho. Amigas, muito bom todo tempo que passamos juntas nos divertindo e quebrando a cabeça com nossos experimentos!

Ao Venício por sua boa vontade e paciência indiscreíveis SEMPRE.

À todos os professores do Laboratório Hertha Meyer por estarem sempre por perto compartilhando suas experiências e contribuindo com valiosas sugestões, em especial ao Serginho.

À Professora Elvira Saraiva pela revisão desta tese.

À todos os colegas do Laboratório Hertha Meyer pelos vários momentos de distração e colaborações, especialmente a Juliana, Gust, Celcinho, e Kildare. Muito Obrigada.

À todos os amigos que fiz durante as aulas, eventos da faculdade, papos de corredor e Congressos de Chagas.

À minha FAMÍLIA que sempre me incentivou e compartilhou das minhas conquistas e alegrias, e também me segurou firme nos momentos mais sofridos. Em especial a você minha vovozinha Maria que adoça ainda mais minha vida com seus mimos e geléias de morango!

À minha nova e tão importante FAMÍLIA. Iara, João e Dami, sempre prontos para dar apoio e carinho em todos os momentos. É muito bom contar com vocês!

E, finalmente, aos meus AMIGOS. Muitos de vocês mesmo um pouco mais distantes são sempre importantes na minha vida, né Nina? Não podia deixar também de agradecer aos meus queridíssimos amigos, Manu, Toninho, Gagá, Spike, LC, Dri, Mamá, Ricardo e Alberto. Obrigadão pelas nossas maravilhosas viagens, cinemas e encontros gastronômicos excepcionais!!!! Com certeza sem nossas risadas o estresse teria me vencido.

### **Esta tese é dedicada**

Aos **meus pais**, meus maiores amigos. Obrigada por todo amor, carinho, e respeito dedicados a mim. Graças à vocês aprendi os maiores valores da vida e é em vocês, SEMPRE, que eu busco o exemplo e a coragem para seguir o melhor caminho. Em especial à você Mamãe que com sua força nos momentos mais difíceis, sua amizade e amor incondicionais sempre soube me trazer paz!

Ao **meu marido**, meu maior amor, cúmplice e companheiro. Edu, sem você minha vida não teria o mesmo sentido. Sempre com uma palavra de incentivo, de carinho me ajuda a seguir em frente com mais determinação. Com você aprendi o significado pleno do amor!

***Amo vocês!!!!***

## RESUMO

### MODULAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE *Trypanosoma cruzi* : LIGAÇÃO, ENDOCITOSE E SHEDDING DE RECEPTORES

Paula Lobão Antunes de Siqueira Torres

Orientadora: Thaís Souto-Padrón

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

No presente trabalho, verificamos que moléculas de imunoglobulinas não-específicas contra o *T. cruzi* se ligam de maneira específica à superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas. Análises comparativas entre parasitos pertencentes à cepa Y ou ao clone CL-Brener mostraram que estas ligações ocorrem com diferentes níveis de afinidade. A ligação de albumina de soro bovino (BSA) à superfície de formas epimastigotas por sua vez, não se mostrou específica. Também foi comparada a atividade endocítica de formas epimastigotas de *T. cruzi* pertencentes à cepa Y e aos clones CL-Brener e Dm28c. Os parasitos foram incubados em presença de Lucifer Yellow ou Albumina de soro bovino e IgG conjugados à marcadores fluorescentes, e a intensidade de fluorescência interiorizada foi analisada através de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. Foi possível observarmos diferenças no nível de material endocitado entre a cepa Y e os clones CL-Brener e Dm28c de acordo com os variados traçadores utilizados. Além disso, a quantidade de moléculas interiorizadas pelos parasitos foi influenciada pelo tipo de fluorocromo conjugado à BSA ou IgG. A análise morfológica do processo endocítico entre as três amostras também revelaram diferenças na porcentagem de células e compartimentos marcados de acordo com o período de incubação. Igualmente importante na modulação da superfície, o shedding foi também detectado em formas epimastigotas do *T. cruzi*. Apesar de observados a baixa temperatura, perfis de shedding foram detectados de maneira mais frequente e intensa em temperaturas mais altas, e de maneira semelhante em presença de IgG, Ferritina Cationizada ou Concanavalina A. Após análises de citometria de fluxo e microscopia eletrônica, o processo de shedding se mostrou dependente da temperatura e energia. Na regulação do processo de “shedding”, a ação de metaloproteases se mostrou importante.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Endocitose, Shedding, Receptores de IgG, Citometria de fluxo, Microscopia eletrônica

Rio de Janeiro  
Outubro de 2006

## ABSTRACT

### *Trypanosoma cruzi* SURFACE MODULATION: RECEPTORS BINDING, ENDOCYTOSIS, AND SHEDDING

Paula Lobão Antunes de Siqueira Torres

Orientadora: Thaís Souto-Padrón

Abstract of the doctorate thesis submitted to the doctoral program in Sciences (Microbiology) at Microbiology Institute Professor Paulo de Góes, Federal University of Rio De Janeiro, as part of the necessary requirements for the attainment of the title of Ph.D in Sciences (Microbiology).

In the present work, non-related immunoglobulins against *T. cruzi* were analyzed through its binding characteristics. We could observe that this binding occurs in a specific manner to epimastigotes and trypomastigotes surface. Comparative analysis between Y strain and CL-Brener clone had shown differences in binding affinity rates. On the other side, bovine serum albumin (BSA) binding to epimastigotes surface did not appear to occur in a specific manner. Analysis comparing the endocytic activity between epimastigote forms from *T. cruzi* belonging to Y strain and to clones CL-Brener and Dm28c were also performed. Analyses by flow cytometry and fluorescence microscopy were performed with parasites incubated in the presence of Lucifer Yellow or fluorescent conjugated BSA and IgG. Differences in endocytosed material rates could be detected between Y strain and clones CL-Brener or Dm28c according to molecule used. Besides that, the amounts internalized by parasites were influenced by fluorochrome type conjugated to BSA or IgG. Morphological analysis between three samples tested had shown variation on percentage of fluorescent cells and compartments according to incubation period. Likewise important on surface modulation, shedding could be observed on epimastigote forms. In trypomastigote forms shedding was still observed at low temperature, however at higher temperatures this process was more frequently and intense. Differences in shedding rate were observed between Y strain and clones CL-Brener or Dm28c according to specific or non-related IgG, cationized ferritin or concanavalin A presence. Metalloproteinase activity appears to be important to shedding regulation.

Kew-words: *Trypanosoma cruzi*, Endocytosis, Shedding, IgG receptors, Flow cytometry, Electron microscopy

Rio de Janeiro  
Outubro de 2006



## **1 – Introdução**

1.1 – O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	2
1.1.1) Formas evolutivas.....	2
1.1.2) O ciclo evolutivo.....	4
1.1.3) Ultraestrutura .....	5
1.2) Modulação de componentes de superfície .....	9
1.3) Dinâmica de superfície em Tripanosomatídeos .....	15
1.3.1) Endocitose .....	19
1.3.2) Capping .....	23
1.3.3) Shedding .....	24

<b>2 – Objetivos</b> .....	28
----------------------------	----

## **3 – Materiais e Métodos**

3.1) Obtenção dos parasitos .....	31
3.2) Obtenção de células hospedeiras.....	31
3.3) Reagentes.....	32
3.4) Tratamentos enzimáticos .....	33
3.5) Experimentos de ligação e saturação.....	34
3.6) Avaliação da atividade endocítica de epimastigotas frente a BSA e IgG .....	34
3.7) Avaliação do shedding de componentes de superfície do <i>T. cruzi</i> sob influência de diferentes moléculas .....	36
3.8) Citometria de Fluxo .....	37
3.9) Microscopia de fluorescência .....	37
3.10) Microscopia eletrônica .....	38
3.10.1) Microscopia Eletrônica de Varredura .....	38

3.10.2) Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	39
3.11) Análises estatísticas .....	40
<b>4 – Resultados</b> .....	41
<b>5 – Discussão</b> .....	99
<b>6 – Conclusões Finais</b> .....	117
<b>7 – Bibliografia</b> .....	119

## *Lista de abreviaturas*

**ATP:** Adenina tri-fosfato

**BSA:** Albumina de soro bovino

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ESAG:** Gens associados ao sítio de expressão de VSG

**Fab:** Fragmento da molécula de imunoglobulina que se liga ao antígeno

**FCS:** Soro fetal bovino

**Fc:** Fragmento cristalizável da molécula de Ig

**FcRs:** Receptor para a porção Fc de Ig

**GPI:** Glicosilfosfatidilinositol

**Ig:** Molécula de imunoglobulina

**IgG:** Imunoglobulina do tipo G

**IgM:** Imunoglobulina do tipo M

**IL:** Interleucina

**LAMP:** “Lysosome-associated membrane protein”, proteína de membrana associada ao lisossoma

**LDL:** “Low density lipoprotein”, lipoproteína de baixa densidade

**LDL-R:** Receptor para LDL

**LIT:** “Liver infusion & tryptose”, infusão de fígado e triptose

**LY:** Lucifer Yellow

**MET:** Microscopia eletrônica de transmissão

**NK:** Células “Natural killers”

**PBS:** “Phosphate buffered saline”, salina tamponada com fosfato

**PI<sub>3</sub>K:** Fosfatidilinositídeo 3-quinase

**SFB:** Soro fetal Bovino

**SI:** Sistema imunológico

**Tf:** Transferrina

**TfR:** Receptor para transferrina

**TNF- $\alpha$ :** “Tumor necrosis factor”

**VSG:** Glicoproteína variável de superfície

# *Introdução*

---

## 1) O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

### 1.1.1. Formas evolutivas

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Tripanossomíase Americana, e da Doença de Chagas, zoonose que ainda hoje possui áreas endêmicas nas Américas, que vão desde o México ao norte, até Argentina e Chile ao sul (WHO, 2002).

O *T. cruzi* é um protozoário uniflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*. Os flagelados pertencentes à esta ordem diferenciam-se de outros flagelados pela presença de uma estrutura especial denominada cinetoplasto, que será descrita na seção 1.1.3. Na família *Trypanosomatidae* vamos encontrar parasitos monoxênicos e heteroxênicos. Os monoxênicos representados pelos gêneros *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Rhynchoidomonas*, são encontrados, p.ex., no intestino de insetos pertencentes aos gêneros *Oncopeltus*, *Musca* e *Zelus*. Já os heteroxênicos alternam seu ciclo biológico entre um hospedeiro invertebrado, insetos como p.ex. os pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius*, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, *Lygaeidae* e hospedeiros definitivos pertencentes à diferentes espécies de vertebrados, dentre eles o homem, e de vegetais. Os Tripanosomatídeos heteroxênicos mais estudados são os pertencentes ao gênero *Trypanosoma*, no qual encontram-se os agentes etiológicos da Tripanossomíase Americana e da Africana, ao gênero *Leishmania* e as distintas espécies a ele pertencentes que são agentes etiológicos dos diferentes tipos de Leishmaniose e ao gênero *Phytomonas* que causam infecções em vegetais de interesse econômico como côco, tomate, pimentão, pimentas, jiló, entre outros (REY, 2001; CAMARGO, 1999).

Durante o ciclo evolutivo do *T. cruzi* são observadas 3 formas evolutivas morfológicamente diferenciadas pela forma do corpo e localização do cinetoplasto em relação à posição do núcleo (HOARE & WALLACE, 1966). São elas: (1) forma **amastigota**, caracteriza-se por sua morfologia oval, com um cinetoplasto em forma de bastão (ou barra) localizado anteriormente ao núcleo, e a presença de um pequeno flagelo que não se encontra aderido ao corpo do parasito, além de apresentar um citóstoma. Esta é a forma de multiplicação no citoplasma das células do hospedeiro vertebrado e também são capazes de infectar estas células (Fig. 1); (2) formas **epimastigotas**, são fusiformes e possuem o cinetoplasto em forma de bastão localizado em posição antero-lateral ao núcleo. O flagelo emerge da bolsa flagelar localizada lateralmente no corpo celular do parasito. Epimastigotas também possuem citóstoma. No ciclo evolutivo os epimastigotas encontram-se aderidos à parede do tubo digestivo do inseto vetor onde se multiplicam ativamente por divisão binária. Essas formas também se replicam em culturas axênicas (Fig. 1); (3) por fim, **formas tripomastigotas**, são as principais formas infectivas que possuem também o corpo celular alongado, cinetoplasto arredondado e a bolsa flagelar presentes na região posterior da célula. Seu flagelo é longo e percorre o corpo celular do parasito firmemente aderido à membrana plasmática, desde a porção posterior (de onde emerge a partir da bolsa flagelar) até à porção anterior, a partir da qual se desprende e continua livremente. Não apresentam citóstoma. Não possuem a capacidade de se multiplicar e podem ser encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado (tripomastigotas sanguíneo) e no reto, urina e fezes do hospedeiro invertebrado quando recebe a denominação de tripomastigotas metacíclicos devido à sua origem na diferenciação à

partir das formas epimastigotas em um processo denominado metaciclologênese (DE SOUZA, 1984, 2000) (Fig. 1).

A heterogeneidade do *T. cruzi*, no entanto, vai além de suas formas durante o ciclo de vida. Muitos estudos já demonstraram uma grande variedade intraespecífica quanto às suas características incluindo além da morfologia, a parasitemia, virulência, patogenicidade e sensibilidade às drogas (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1992)

### **1.1.2. O ciclo evolutivo**

Insetos hematófagos pertencentes às espécies *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, popularmente conhecidos por “barbeiro” ou “chupão”, são os vetores mais comuns do *T. cruzi* no Brasil. O ciclo biológico no hospedeiro invertebrado pode ser iniciado através do repasto sangüíneo no hospedeiro vertebrado infectado. Formas tripomastigotas sangüíneas ingeridas, se transformam em epimastigotas ainda no estômago do inseto vetor e migram para o intestino médio onde se multiplicam. Alcançando o intestino posterior os epimastigotas se fixam às glândulas retais onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Durante novo repasto sangüíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas livres nas fezes ou urina do vetor são depositadas na pele do hospedeiro vertebrado e alcançam o tecido subcutâneo através de lesões já existentes na pele ou causadas pela própria picada do inseto, ou ainda através de membranas mucosas, onde irão infectar preferencialmente macrófagos e fibroblastos. Dentro das células, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. Estas, por fissão binária, se multiplicam preenchendo o citoplasma da célula hospedeira. Os amastigotas são então capazes de se diferenciar em tripomastigotas que preenchem grande parte do citoplasma da célula hospedeira, rompendo por fim, a célula infectada e recomeçando o

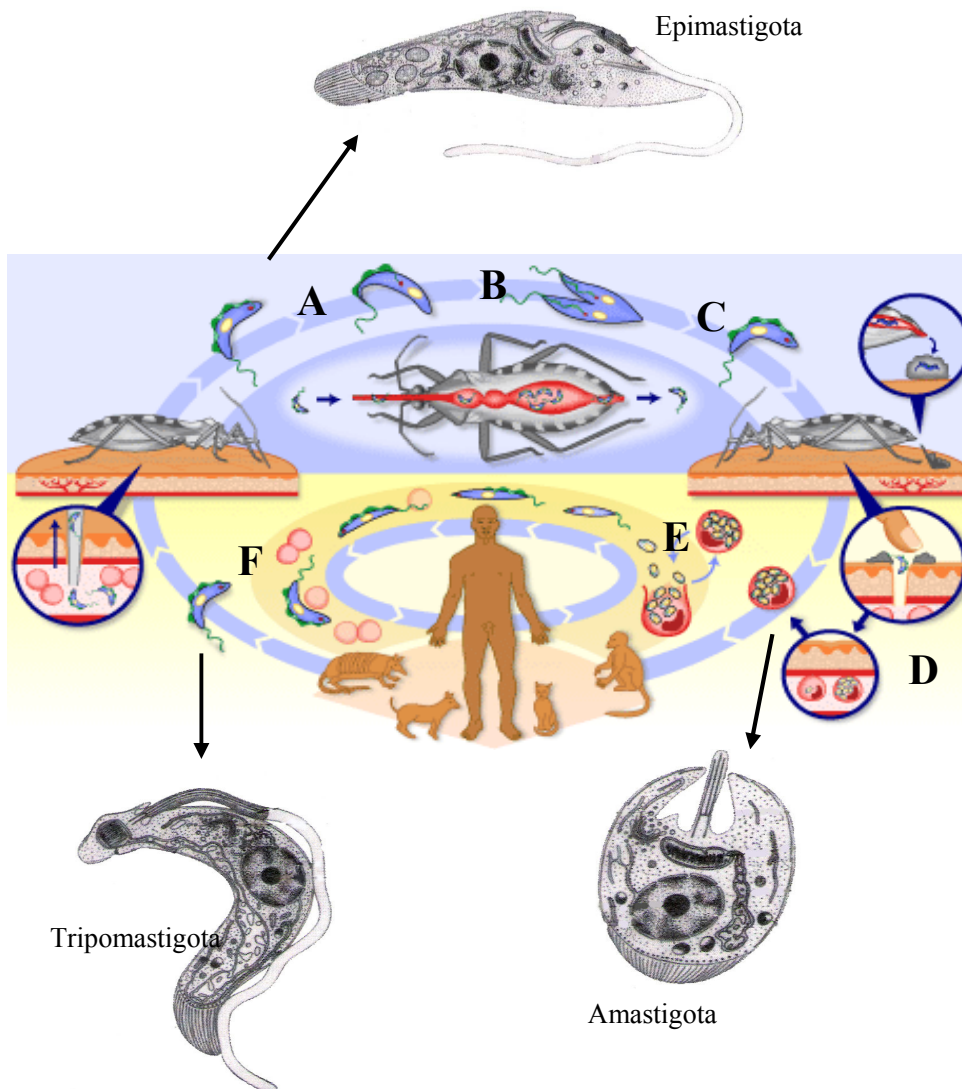
ciclo nas células adjacentes ou alcançando a circulação sanguínea. Uma vez atingindo a circulação, tripomastigotas sanguíneos podem propagar a infecção por todo o organismo, e, neste caso preferencialmente células musculares estriadas e lisas, ou ainda serem ingeridos pelos vetores e iniciar a infecção no hospedeiro invertebrado completando o ciclo de vida (Fig. 1). (PETERS & GILLES, 1991).

### 1.1.3. Ultraestrutura

Os membros da família *Trypanosomatidae* possuem uma única mitocôndria altamente ramificada que se estende por todo o corpo celular. O DNA mitocondrial que nestes protozoários pode corresponder a 20-30% do DNA total da célula forma um arranjo de filamentos compactados em uma região específica da mitocôndria, próximo ao corpúsculo basal constituindo o **cinetoplasto** (Fig. 2).

Os **microtúbulos subpeliculares** (MS) também constituem uma das principais características ultraestruturais dos tripanosomatídeos, formando uma camada única localizada logo abaixo da membrana plasmática. São microtúbulos estáveis que se dispõem longitudinalmente ao longo do corpo celular em arranjo helicoidal (ANGELOPOULOS, 1970; SASSE & GULL, 1998; SHERWIN & GULL, 1989; SOUTO-PADRÓN, CUNHA E SILVA & DE SOUZA, 1993). Os microtúbulos subpeliculares conectam-se entre si e à membrana plasmática através de proteínas filamentosas, criando uma trama protetora ao longo de toda a superfície do parasito sendo os grandes responsáveis pela sua resistência à ruptura por efeitos mecânicos, temperatura e drogas (DE SOUZA, 1999) (Fig. 2). Secções transversais em diferentes regiões na forma tripomastigota do *T. cruzi* mostram que os microtúbulos subpeliculares,





**Figura 1: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros vertebrados e no inseto vetor.** Formas tripomastigotas sanguíneas podem propagar a infecção por todo o organismo ou serem ingeridas pelos vetores. No inseto os parasitos se transformam em epimastigotas (A) que se dividem no intestino médio. Alcançando o intestino posterior (B), se transformam em tripomastigotas metacíclicos e apresentam-se fixadas às glândulas retais, de onde podem ser passadas para as fezes do inseto (C). As formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas a partir das fezes do vetor penetram na pele do hospedeiro através de lesões pré-existentes ou provocadas pela própria picada do inseto (D) alcançam o tecido onde irão infectar preferencialmente macrófagos e fibroblastos. No citoplasma da célula hospedeira as formas tripomastigotas se transformam em formas amastigotas que se multiplicam. Uma vez rediferenciados em tripomastigotas, são liberados para o meio extracelular (E), recomeçando o ciclo nas células adjacentes ou alcançando a circulação sanguínea (F) e finalmente completando o ciclo biológico deste parasito. (Rey, 2001; Brener, 2000).

medem entre 18 e 22 nm de diâmetro e encontram-se regularmente espaçados por uma distância média de 44 nm (centro a centro).

Todos os tripanosomatídeos possuem uma invaginação da membrana plasmática onde o flagelo emerge da célula. Esta invaginação recebe o nome de **bolsa flagelar**. Nesta região não é observada a camada de microtúbulos subpeliculares, o que facilita a formação de vesículas de endocitose que é a forma de aquisição de nutrientes por estes organismos (Fig. 2). Nas formas evolutivas onde o processo endocítico é mais ativo, foi verificado que macromoléculas que ganham acesso ao interior da bolsa podem ser endocitadas por vesículas que brotam da membrana, no fundo da bolsa flagelar, em direção ao citoplasma, e parecem se fundir, liberando o seu conteúdo em organelas intracelulares comparadas com os endossomas de células de mamíferos. A presença de certas hidrolases no lúmen da bolsa flagelar é uma forte indicação de que nesta região possam ser realizadas funções de compartimento pré-lisossomais. É possível também, que este seja o principal sítio onde ocorre a exposição de proteínas da membrana plasmática e de secreção de proteínas para o meio extracelular (DE SOUZA, 1984 ; WEBSTER & RUSSEL, 1993).

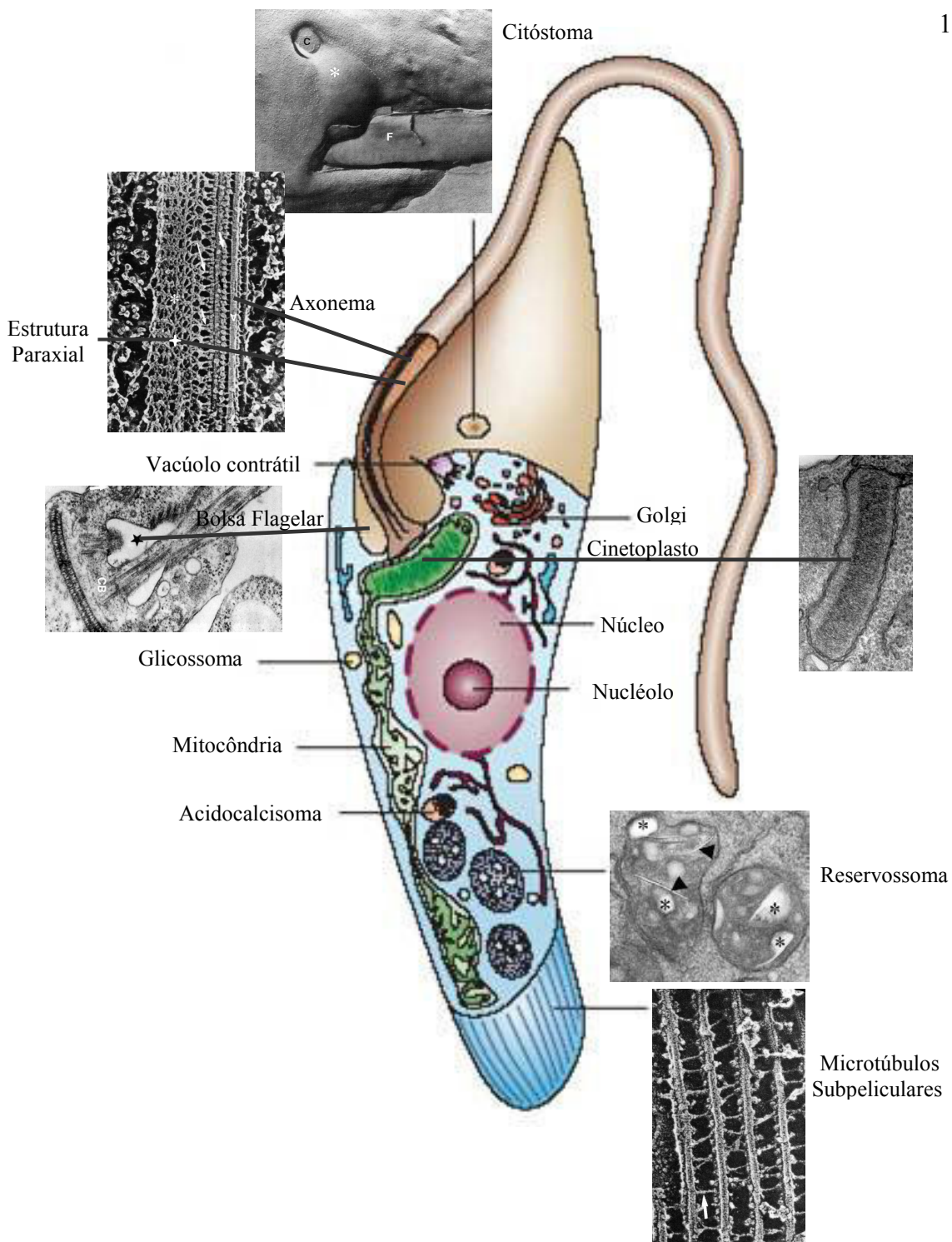
O **citóstoma** é uma outra região especializada da membrana plasmática, observada em formas epimastigotas e amastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Apresenta-se em formato de uma depressão afunilada, que penetra no citoplasma próximo à localização do Golgi (DE SOUZA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALES-ROBBLES, 1978) (Fig.1). Em observações feitas em microscopia eletrônica de transmissão (MET), detectou-se a presença de um arranjo especial de microtúbulos ao longo do citóstoma formado por 5 a 10 microtúbulos não pertencente à rede de microtúbulos subpeliculares,

sugerindo-se que sua função está ligada aos movimentos de abertura e fechamento desta estrutura, além de sua sustentação (CLAYTON, HÄUSLER & BLATTNER, 1995). Estudos em microscopia eletrônica de transmissão mostram um glicocálice exuberante, que é fortemente marcado pelo vermelho de rutênio e por lectinas, particularmente por concanavalina A (MARTINEZ-PALOMO, DE SOUZA & GONZALES-ROBBLES, 1976; DE SOUZA, 1984). Os primeiros estudos voltados para a análise da composição de membrana através da técnica de criofratura, mostraram que a membrana plasmática na região do citóstoma é lisa com poucas partículas intramembranas inseridas na chamada face P (região externa do folheto interno da membrana plasmática) desta estrutura (DE SOUZA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALES-ROBBLES, 1978). No entanto, estudos realizados com a técnica de “fracture flip” que mostra a verdadeira face da membrana voltada para o meio externo, mostraram que a membrana na região do citóstoma se apresentava muito mais rugosa do que a membrana do corpo, sugerindo a presença de moléculas projetadas para o meio extracelular (PIMENTA et al., 1989). Marcadores dos processos de endocitose de fase fluida e de endocitose mediada por receptor, tais como peroxidase, transferrina, albumina e LDL, já foram detectados ligados ao citóstoma, confirmando sua importante função no processo endocítico *do Trypanosoma cruzi* (DE SOUZA, CARVALHO & BENCHIMOL, 1978 ; SOARES & DE SOUZA, 1991 ; PORTO-CARREIRO et al., 2000). O citóstoma se continua com uma outra estrutura denominada citofaringe que é responsável pela interiorização das moléculas ligadas ao citóstoma (DE SOUZA, CARVALHO & BENCHIMOL, 1978; SOARES & DE SOUZA, 1991 ; PORTO-CARREIRO et al., 2000). Vesículas formadas a partir daí são observadas formando uma estrutura tubular, multivesiculada, localizada

na porção mediana da célula, correspondente aos endossomas primários de células de mamíferos (PORTO-CARREIRO et al., 2000). Os compartimentos endossomais tardios apresentam-se na parte posterior da célula. Alguns estudos sugerem que os endossomas tardios sejam correspondentes à compartimentos pré-lisossomais, com a presença de enzimas características, mas com estrutura e função distinta dos lisossomas (MUKHERJEE, GHOSH & MAXFIELD, 1997). Em formas epimastigotas do *T. cruzi*, o acúmulo do material endocitado ocorre em organelas denominadas **reservossomas** localizadas preferencialmente na região posterior, contendo inclusões elétron-transparentes que se destacam no interior de uma matriz (SOARES & DE SOUZA, 1988). Estudos citoquímicos indicam que as inclusões correspondem a lipídeos e a matriz é constituída essencialmente de proteínas (SOARES & DE SOUZA, 1988). Apesar do baixo pH e a presença de cisteíno proteinase, não foram detectados, nesta organela, receptores de manose 6-fosfato, proteínas estruturais de membrana de lisossomos (LAMP1 e LAMP2), ou mesmo a presença de fosfatase ácida. Mesmo assim, sugeriu-se que os reservossomos funcionam como compartimentos pré-lisossomais (SOARES, SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1992). (Fig. 2)

## **1.2. Modulação de componentes de superfície**

As interações entre diferentes células assim como a comunicação entre a superfície e o interior de uma única célula, dependem de interações estruturais e físico-químicas, como acontece na ligação de receptores e sítios sob a membrana citoplasmática. Por isso a modulação de proteínas de superfície de qualquer tipo celular é tão importante durante o seu ciclo de vida. Teoricamente existem 3 maneiras de se



**Figura 2: Esquema mostrando aspectos gerais da ultraestrutura da forma epimastigota.** (Adaptado de Do Campo et al., 2005). Fotos: citóstoma, microtúbulos subpeliculares, flagelo, e bolsa flagelar, Brener, 2000; cinetoplasto, P.L.A.S. Torres, T. Souto-Pradrón; reservossoma, Cunha e Silva et al., 2006.

modificar ou modular a superfície de uma célula: a exocitose, a endocitose e o “shedding”.

O tráfego de vesículas não é restrito apenas ao interior da célula. Ele ocorre também até ou a partir da membrana citoplasmática. Proteínas, lipídeos e carboidratos recém formados são levados do retículo endoplasmático, via Golgi, até a superfície celular através de vesículas de transporte que se fundem com a membrana plasmática no processo conhecido como exocitose. Este processo é importante para o aporte dos componentes da membrana plasmática reconhecidos por outras células como ligantes específicos, ou moléculas que ganham acesso ao meio extracelular podendo agir como sinalizadoras autócrinas, parácrinas ou endócrinas.

A endocitose é importante por manter a homeostase celular, o que inclui a manutenção da área total da membrana plasmática que é aumentada pelo processo de exocitose, a obtenção de vários nutrientes essenciais, a transmissão de estímulos neuronais, metabólicos e até proliferativos, e, em alguns casos mais especializados, células que possuem a capacidade de interiorizar até mesmo outras células (MELLMAN, 1996). Resumidamente, o material a ser ingerido é progressivamente englobado por uma pequena porção de membrana plasmática, da qual formam-se e brotam vesículas endocíticas. O material ingerido é ultimamente encaminhado para os lisossomas, onde é digerido. É através da endocitose que as células podem modular a resposta a estímulos exógenos como por exemplo hormônios e fatores de crescimento. Este processo chama-se “down-regulation” pós-transcricional. É um fenômeno rápido, dependente do ligante e geralmente baseado numa endocitose acelerada seguida de um direcionamento destes complexos receptor-ligante para uma via degradativa, tendo

como principal função a inibição da geração contínua de sinais induzidos por estes ligantes (CARPENTER & COHEN, 1976).

O “shedding” de proteínas de membrana é bem reconhecido como um importante mecanismo de regulação celular e interação célula-célula, e célula-moléculas. Este processo representa um sistema comum, controlando a atividade de um amplo e heterogêneo grupo de proteínas transmembranas e capaz de induzir a clivagem de ectodomínios em diversas sequências, além de responder a múltiplos ativadores (SBARBA & ROVIDA, 2002). O “shedding” é responsável pelo fenômeno de “down-modulation” ou “trans-modulation”. Este fenômeno é independente da presença de um ligante ou de um receptor funcionalmente ativo (DOWNING, ROUSSEL & SHERR, 1989) e, geralmente ocorre pela ação de endoproteases (shedases, ou secretases, ou convertases) resultando na liberação (**shedding**) de uma grande porção, frequentemente toda a porção extracelular (ectodomínio) de proteínas de membrana (SBARBA & ROVIDA, 2002). Como este processo é regulado, ainda não se sabe exatamente. Uma das maneiras pela qual o “shedding” de proteínas transmembranas parece ocorrer, é pela clivagem de sequências de aminoácidos ainda pouco caracterizadas localizadas entre o domínio extracelular e a região transmembrana, bem próxima à superfície celular (EHLERS ET AL, 1996). No entanto, não se sabe se isto poderia ocorrer pelo reconhecimento da sequência ou simplesmente pela sua acessibilidade. O “shedding” do receptor do tipo I para TNF- $\alpha$  se mostrou amplamente dependente de uma região entre a sequência transmembrana e um domínio extracelular conservado rico em cisteína (BRAKEBUSH ET AL, 1994). Alguns estudos indicam que a liberação de proteínas de membrana requer a presença

de uma sequência de pelo menos 11 resíduos, porém o seu comprimento exato e suas características que conferem suscetibilidade permanecem indeterminadas (SCHWAGER ET AL, 1998). Uma vez que a clivagem ocorre no meio extracelular, o “shedding” é geralmente considerado independente da região citoplasmática. No entanto, em alguns casos (p.ex. TGF- $\alpha$ ) a região citoplasmática do substrato está envolvida na regulação da clivagem extracelular (BRILEY ET AL, 1997). Na maior parte dos casos onde as convertases foram identificadas, se observou enzimas transmembranas do tipo desintegrinas/metaloproteases-Zn (ADAM) (SBARBA & ROVIDA, 2002). As ADAMs exibem uma cadeia citoplasmática bem mais longa (120-130 aminoácidos) do que outras famílias de metaloproteases, tornando-as mais atuantes no processo de “shedding” por seu maior potencial no domínio citoplasmático como alvo de sinais ativadores intracelulares (SBARBA & ROVIDA, 2002).

A ativação de proteína quinase C (PKC) foi o primeiro mecanismo intracelular reconhecido como um alvo comum para a sinalização que gera o “shedding” de ectodomínios. Por outro lado, outros mecanismos independentes de PKC capazes de sinalizar para o “shedding” também foram identificados. Estas vias de sinalização envolvem tirosinas quinases do tipo citoplasmática (CTK) e de receptor (RTK), proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), proteína quinase A (PKA), fosfolipase A (PLA) e calmodulina além de fluxo de  $Ca^{++}$ .

Uma outra forma de componentes de membrana serem liberados para o meio extracelular, é o “shedding” de vesículas de membrana. Este processo foi descrito em células tumorais (CASSARA ET AL, 1998; DOLO ET AL, 1994) e em algumas células normais (DAINIAK, 1991). Estudos revelaram que a presença de soro fetal



bovino estimulou significativamente o “shedding” de vesículas de membrana em linhagens de células obtidas a partir de carcinoma de mama (DOLO ET AL, 1994), provavelmente pela ação de metaloproteases e gelatinases (CASSARA ET AL, 1998).

A modulação de componentes de superfície é bastante importante nos parasitos, uma vez que o ambiente hospedeiro possui características bastante inóspitas à estas células. Na medida em que hospedeiros e parasitos evoluem para se adaptarem uns aos outros, observa-se o desenvolvimento de mecanismos seletivos importantes principalmente na manutenção da sobrevivência dos parasitos. Variadas estratégias utilizadas para o escape da ação do sistema imunológico (SI) do hospederio podem ser detectadas em diferentes parasitos. Um dos mecanismos de escape conhecidos é a capacidade que alguns parasitos tem de se isolar das agressões do ambiente em que se encontram através do seu encistamento, como é o caso de *Echinococcus granulosus*, *Toxocara canis*, *Pneumocystis carinii*, *Entamoeba* ou ainda *Toxoplasma gondii*. O fato destes parasitos se manterem dentro de cistos, os protege não só da ação do SI como também de outras condições desfavoráveis ao seu desenvolvimento (CAMUS et al., 1995). Além disso, alguns parasitos são capazes de mimetizar proteínas do hospedeiro, ou ainda de se apropriar de moléculas do hospedeiro exibindo-as na sua superfície e, enganando assim a ação do sistema imunológico, em um processo denominado mimetismo (BLOOM, 1979).

Durante o curso de doenças parasitárias, os receptores para a porção Fc de imunoglobulinas têm grande importância. Estudos desenvolvidos com camundongos “knockout” para a cadeia  $\gamma$  de FcRs, mostraram que estes são incapazes de recrutar processos fagocíticos ou de citotoxicidade mediada por células dependentes do

reconhecimento de anticorpos (PLEASS & WOOF, 2001). Curiosamente, certas bactérias e vírus expressam em sua superfície moléculas que ligam especificamente subunidades Fc de imunoglobulinas. Como exemplos, temos a proteína A expressa pelo *Staphylococcus aureus* e gE-gI nos vírus Herpes simplex, que conferem vantagens à estes organismos por perturbarem funções dependentes de Fc como as interações com fagócitos (NAGASHUNMUGAM et al., 1998 ; PLEASS et al., 2001). Receptores para imunoglobulinas também já foram descritos em parasitos, apesar de serem menos caracterizados. Dentre estes, incluem-se o *Schistosoma mansoni* (LOUKAS et al., 2001), os cestodas *Taenia. crassiceps*, *T. solium* , *T.pisiformis*, *Echinococcus multilocularis*, *E.granulosus* (KALLINA & MCMANUS, 1993 ; CRAIG, 1988 ; WHITE, ROBINSON & KUHN, 1997 ; ALKARMI, ALSHAKARCHI & BEHBEHANI, 1988 ; BAZ et al., 1998), os nematodos *Heligmosoides polygyrus* (ENRIQUEZ, BOGGAVARAPU & BRADLEY-DUNLOP, 1992) e protozoários como *Toxoplasma gondii* (VERCAMMEN et al., 1999) e espécies patogênicas da família *Trypanosomatidae* (VINCENDEAU & DAERON, 1989). A ligação destes receptores à moléculas de imunoglobulinas do hospedeiro é capaz de ajudar no escape da ação do sistema complemento através da indisponibilização de determinantes antigênicos capazes de ativar a cascata de ativação deste sistema, assim como é capaz de facilitar a invasão destes parasitos na célula hospedeira (MIRANDA-SANTOS & CAMPOS NETO, 1995).

### **1.3. Dinâmica de superfície em Tripanosomatídeos**

A modulação de proteínas de superfície é igualmente importante nos tripanosomatídeos. Interações entre parasito-célula hospedeira assim como a

comunicação com o meio extracelular são essenciais para a manutenção do ciclo de vida destes protozoários.

A capacidade de sobrevivência dos tripanosomatídeos em seus hospedeiros, reflete o fato de que estes organismos desenvolveram mecanismos de escape tanto à imunidade inata, quanto à imunidade adquirida. Um bom exemplo de adaptação de um parasito ao sistema imunológico de seu hospedeiro é observado nos tripanosomas africanos, encontrados livremente na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados. Sua superfície composta principalmente por antígenos glicoprotéicos diversos (proteínas de variação antigênica), os quais o parasito pode modular, serve como barreira na prevenção do reconhecimento de anticorpos. Outro possível e importante mecanismo de modulação antigênica já detectada não só em *T. brucei* (BLOOM, 1979), como em *T. cruzi* (SCHMUÑIS et al., 1978; 1980) e *Leishmania* (DOYLE et al., 1974), é a capacidade de realizar processos de “capping” e “shedding” de seus antígenos de superfície, escapando assim da ação do sistema imunológico.

A via alternada do sistema complemento também constitui uma importante ação do sistema imunológico durante a eliminação de agentes invasores. No entanto, alguns parasitos apresentam-se resistentes à sua ação. No *T. cruzi* por exemplo, enquanto formas não-infectivas são destruídas, as formas tripomastigotas infectivas são resistentes à ação lítica do complemento. Essa resistência está relacionada com a expressão de proteínas na superfície do parasito, com propriedades semelhantes ao DAF humano (decay-accelerating factor), uma proteína que interfere na ligação do componente B ao C3b, diminuindo a formação da C3 convertase (RIMOLDI et al., 1988 ; TAMBOURGI et al., 1993).

Receptores envolvidos no reconhecimento antigênico por células do sistema imunológico, incluem receptores de células B (BCRs) e receptores de células T (TCRs). No caso dos receptores para Fc (FcRs), não ocorre o reconhecimento direto dos antígenos, mas sim da porção Fc de anticorpos. Quando a ligação de FcRs ocorre, os anticorpos permitem o reconhecimento antigênico específico por uma variedade de células, em muitos casos, destituídas de estruturas específicas para tal. Muitos FcRs compartilham sítios de ativação com BCRs e TCRs e, sob apropriadas condições, podem ativar respostas através das mesmas vias que receptores de antígenos (DÄERON, 1997). Os receptores celulares para o domínio Fc das imunoglobulinas, têm sido um dos grandes enigmas para os imunobiologistas desde sua descoberta há mais de 30 anos, quando foi observado que anticorpos IgG possuíam grande afinidade por macrófagos quando apresentados como hemácias opsonizadas. Além disso, esta ligação se mostrou independente da região F(ab) do anticorpo (BERKEN & BENACERRAF, 1966). FcRs existem como receptores de membrana, assim como moléculas solúveis, produzidas através de “splicing” alternativo de transcritos para estes receptores, ou através de proteólise dos receptores de membrana (DÄERON, 1997). Estas glicoproteínas de superfície, conhecidamente distribuídas em inúmeros tipos celulares hematopoiéticos (monócitos, macrófagos, todos os tipos de granulócitos, linfócitos T e B e NKs), possuem especificidade por diferentes isotipos de imunoglobulinas e são capazes de mediar uma grande variedade de respostas quando esta ligação ocorre (RAVETCH & KINET, 1991).

A habilidade de mediar importantes atividades biológicas que vão desde a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), até a fagocitose e o

recrutamento de células efectoras, já é conhecida em células isoladas. Apesar disso, a principal função destes receptores *in vivo*, permaneceu completamente obscura por bastante tempo. Alguns estudos foram capazes de definir um importante e inesperado papel destes receptores na iniciação do processo inflamatório, e parecem ser os maiores contribuintes para o processo de regulação dos linfócitos na produção de anticorpos (TAKAI et al., 1994; DOMBROWICZ et al., 1993).

A ligação de imunoglobulinas não-específicas em *T. cruzi*, ocorre através de receptores específicos presentes na superfície do parasito, capazes de reconhecer as porções Fc e Fab de imunoglobulinas do tipo G (IgGs) (MIRANDA-SANTOS & CAMPOS-NETO, 1981; CICARELLI & DANIEL LOPES, 1989; CAMPOS-NETO et al., 2003). Diferentes espécies e formas evolutivas de tripanosomatídeos foram submetidas ao contato com hemácias de carneiro sensibilizadas com doses subaglutinantes de IgG, IgM, ou com a porção F(ab')<sub>2</sub> do anticorpo anti-hemácia de carneiro, e a formação de rosetas entre parasitos e hemácias foi observada. Os resultados obtidos deste simples teste de rosetas, indicaram a presença de um receptor com grande especificidade para a porção Fc de IgG, sintetizado pelo próprio parasito. Curiosamente presente apenas nos membros patogênicos da família Trypanosomatidae, este receptor parece não ser essencial para a sobrevivência destes organismos, mas importante na adsorção de proteínas do hospedeiro por parte destes parasitos (MIRANDA-SANTOS & CAMPOS-NETO, 1981). Outra importante função biológica para ligação de IgG via receptor Fc no *T. cruzi* foi observada em experimentos que comprovaram um significativo aumento da capacidade infectiva deste organismo após o tratamento com anticorpos monoclonais do tipo IgG1, sejam

estes específicos ou não contra o parasito. Um considerável aumento da infectividade também pôde ser observado com o tratamento das formas tripomastigotas apenas com a porção Fc de IgG humana (CUNA, KIERSZENBAUM & WIRTH, 1991).

Uma proteína de 52kDa, resistente à ação da tripsina foi caracterizada em formas tripomastigotas de *T. cruzi* como sendo capaz de ligar-se à IgG. Fragmentos Fc de IgGs não são necessários para a esta ligação, que parece ser mediada apenas pela porção da molécula que se liga ao antígeno, a chamada porção Fab. Uma vez realizada a ligação, é ativada uma forte ação proteolítica capaz de digerir moléculas de IgGs, impedindo a subsequente ativação da cascata do complemento, dando a esta molécula uma conotação importante na capacidade de escape deste parasito à resposta imunológica do hospedeiro (CICARELLI & DANIEL LOPES, 1989).

### **1.3.1. Endocitose**

Os tripanosomatídeos pertencentes ao gênero *Trypanosoma* possuem um complexo ciclo de vida e, algumas das diferentes formas evolutivas observadas requerem componentes exógenos para seu crescimento, como o colesterol (COPPENS et al., 1987; 1988) e o ferro (CHANG & CHANG, 1985; GALBRAITH & MCEL RATH, 1988). Devido à presença dos arranjos de microtúbulos subpeliculares, a captação destes nutrientes ocorre através de duas regiões já dicitadas anteriormente, a bolsa flagelar e o complexo citóstoma-citofaringe (LANGRETH & BALBER, 1975; DE SOUZA, 1984; COPPENS et al., 1987; PORTO-CARREIRO et al., 2000).

A forma tripomastigota sanguínea do *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da doença do sono em humanos, tornou-se o modelo de endocitose melhor estudado em

tripanosomatídeos. Verificou-se através dos diversos estudos realizados, que esta espécie possui uma intensa atividade endocítica. Enquanto a albumina sérica é adquirida através de endocitose de fase fluida, a transferrina e o LDL são interiorizados através de endocitose mediada por receptor (COPPENS et al., 1987; WEBSTER & GRAB, 1988). Os primeiros relatos de captação de ferro neste organismo surgiram em 1975, através de estudos realizados por Langreth & Balber, onde as formas tripomastigotas foram submetidas à endocitose de ferritina nativa. A 25°C observou-se a presença do ligante no interior da bolsa flagelar e em vesículas recém formadas, enquanto à 0°C houve um acúmulo de ferritina na bolsa flagelar. A confirmação de que a captação de ferro por estes parasitos constitui-se num processo mediado por receptores foi primeiro demonstrada por Coppens e seus colaboradores em 1987, pela observação da eficiência de captura de ferritina e LDL radioativos. Outra importante evidência foi o ponto de saturação das ligações atingido frente a altas concentrações do ligante, indicando a presença de um número limitado de sítios de ligação. A identificação do receptor para a proteína plasmática transportadora de ferro foi realizada em *T. brucei* por Grab e colaboradores em 1993. Estes autores o descreveram como uma proteína de 42 kDa, que apresenta-se associada à membrana via âncoras de GPI. Hoje sabe-se que o receptor para transferrina em *T. brucei* é codificado por genes associados à sítios de expressão, o ESAG6 e o ESAG7, que, por sua vez apresentam-se associados à expressão da glicoproteína variante de superfície (VSG), principal molécula antigênica do parasito (SCHELL et al., 1991; STEVERDING et al., 1994; SALMON et al., 1994). A partir da bolsa flagelar a transferrina endocitada é observada em vesículas revestidas por um “coat”, e em seguida em estruturas tubulares muito semelhantes a endossomas de células de mamíferos

(WEBSTER & RUSSEL, 1993). Uma vez em contato com o ambiente acidificado dos endossomas, nas células eucarióticas, estes receptores sofreriam uma dissociação podendo então ser reciclados para a membrana plasmática. No entanto, em tripanosomatídeos os complexos receptor-ligante são endereçados para estruturas semelhantes a lisossomos onde sofrem a degradação por enzimas proteolíticas (WEBSTER & GRAB, 1988; WEBSTER & FISH, 1989; WEBSTER, 1989; CLAYTON, HÄUSLER & BLATTNER, 1995).

O principal esteroide presente na membrana de formas sanguíneas do *T. brucei* é o colesterol. Uma vez que não se tem evidência da síntese deste por parte do parasito, assume-se que este lipídeo é incorporado a partir do hospedeiro (COPPENS et al., 1988). No entanto, na corrente sanguínea dos mamíferos o colesterol não é encontrado livremente, e sim na forma éster ligado à partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estudos indicam que o receptor para LDL (LDL-R) em *T. brucei*, corresponde a uma proteína de 145 kDa que contém um fragmento de 86 kDa responsável pela ligação da molécula ao LDL (COPPENS et al., 1988; 1991; 1992). Apesar do conhecimento da existência de um processo de degradação da partícula de LDL, para a utilização do colesterol por parte do parasito, pouco se conhece a respeito da rota intracelular desta partícula. O que se sabe é que, ao contrário do receptor para transferrina (TfR), os LDL-R são reciclados para a membrana deste organismo (COPPENS et al., 1993).

A endocitose é também bastante importante na modulação de proteínas na superfície da célula. Sabe-se que toda a VSG da superfície de *T. brucei* é endocitada e excitada a cada 12,5 minutos. O caminho percorrido pela VSG através dos compartimentos endocíticos se inicia através de vesículas revestidas com clatrina que



seguem da bolsa flagelar para a área do núcleo. Nesta região as moléculas de VSG preenchem compartimentos endocíticos Rab-5 positivos e daí vão para compartimentos Rab-11 positivos, endossomas de reciclagem, de onde podem voltar para a membrana citoplasmática (OVERATH & ENGSTLER, 2004).

Em *Leishmania* a presença de Tf-R foi demonstrada através do isolamento de um polipeptídeo de 70 kDa na superfície de formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e apenas na superfície de formas promastigotas de *L. infantum* e *L. major* (VOYIATZAKI & SOTERIADOU, 1990; 1992).

O processo de endocitose em *Trypanosoma cruzi* não é ainda tão bem conhecido como o de *T. brucei*. Diferentes complexos de ouro coloidal foram utilizados para o estudo da via endocítica em *T. cruzi* (SOARES & DE SOUZA, 1991; SOARES, SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1992; PORTO-CARREIRO et al., 2000). A peroxidase (HRP) e a BSA foram utilizadas para se identificar o processo endocítico de fase fluída (DE SOUZA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALES-ROBBLES, 1978; SOARES & DE SOUZA, 1991).

No estudo da via endocítica mediada por receptor no *T. cruzi*, a transferrina e o LDL foram utilizados como moléculas traçadoras. Como resultado observou-se que a endocitose mediada por receptores em epimastigotas ocorre em vesículas no fundo da bolsa flagelar e na porção final da citofaringe, algumas vezes revestidas por clatrina (SANT'ANNA, DE SOUZA & CUNHA-E-SILVA, 2004). No entanto, nenhum receptor para o LDL ou para a Tf foi efetivamente isolado e caracterizado. A presença dos receptores para a Tf e o LDL é sugerida baseada em estudos de ligação e interiorização destas moléculas conjugadas a fluorocromo ou complexadas a partículas de ouro coloidal

(LIMA & VILLALTA, 1990; SOARES & DE SOUZA, 1991; SOARES, SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1992; PORTO-CARREIRO et al., 2000).

### 1.3.2. Capping

Devido à fluidez da membrana citoplasmática, alguns de seus componentes sofrem difusão lateral. A redistribuição destes componentes inclui a formação de agregados de proteínas em algumas regiões da superfície celular, processo conhecido como “capping”, descrito pela primeira vez em linfócitos (NICOLSON, 1976). A influência da ação de anticorpos no disparo de processos de modulação de antígenos de superfície já é descrito há bastante tempo (BARRY, 1979).

O “capping” já foi observado em diversos protozoários, incluindo espécies de *Entamoeba* (PINTO DA SILVA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALES-ROBLES, 1975) e *Naegleria* (PRESTON O'DELL & KING, 1975). Este fenômeno já foi observado também em alguns membros da família *Trypanosomatidae* como *Leishmania* (DOYLE et al., 1974; DWYER, 1976, SARAIVA et al., 1989, PIMENTA et al., 1994), *Trypanosoma brucei* (BARRY, 1979), *T. lewisi* (GIANNINI & DÁLESSANDRO, 1978; CHERIAN & DUSANIC, 1977). Quando formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* foram incubadas por 30 min à 4°C em presença de soro obtido de pacientes chagásicos ou de camundongos infectados, apenas uma pequena porcentagem da população de parasitos apresentou “capping”. No entanto, quando após a incubação à 4°C a temperatura foi aumentada para 37°C, um grande número de parasitos formaram perfis de “capping” em sua superfície. Após o tratamento das células com azida sódica, este processo foi inibido, indicando a dependência de energia para que este ocorra. O tratamento com citocalasina B ou colchicina por sua vez, não interferiu na formação destes agregados (SCHMUÑIS et

al., 1978, 1980). O “capping” na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi* também foi observado em experimentos realizados em presença de Concanavalina A (SZARFMAN, QUEIROZ & DE SOUZA, 1980).

Algumas possíveis hipóteses existem para se explicar o papel funcional deste processo no *T. cruzi*. Uma delas é que estes agregados formados facilitem sua eliminação da superfície do parasito através do mecanismo de “shedding”. Também é possível que esta mobilidade de antígenos de superfície induzida por anticorpos no *T. cruzi* ou em outros parasitos confira resistência às defesas do hospedeiro (DE SOUZA, 1984). Segundo o modelo de Zipper, a fagocitose mediada por receptores Fc presentes na superfície de macrófagos requer que os parasitos tenham anticorpos distribuídos de maneira homogênea em sua superfície, sendo assim, parasitos que apresentem perfis de capping seriam mais dificilmente ingeridos (DE SOUZA, 1984).

### **1.3.3. Shedding**

O “shedding” de ectodomínios pode ser comumente relacionado à patofisiologia de doenças, particularmente na defesa do hospedeiro e na resposta à danos teciduais (SBARBA & ROVIDA, 2002). Ectodomínios podem ter diversas funções biológicas, por exemplo: (a) a “down-modulation” na superfície celular, resultando numa inibição direta da interação receptor-ligante e uma consequente alteração dos efeitos regulatórios e/ou adesivos de moléculas exibidas na célula; (b) a geração de receptores solúveis que poderão competir com seus próprios ligantes alterando a concentração efetiva de ligante na célula; (c) ou ainda a geração de porções transmembrana/citoplasmáticas das

moléculas que podem ter funções de sinalização diferente das moléculas originais (SBARBA & ROVIDA, 2002).

Diversas citocinas e fatores de crescimento são biologicamente ativos quando mantidos na superfície celular. Desta maneira, a localização na superfície pode restringir a atividade destes fatores à um pequeno e específico ambiente, enquanto sua liberação pode levar à efeitos mais distantes (PESCHON et al., 1998). Receptores liberados da superfície por “shedding” podem vir a participar na regulação da atividade biológica de ligantes atuando como agonistas ou antagonistas, além de deixar as células menos reativas aos seus ligantes cognatos (HEANEY & GOLDE, 1996).

Formas solúveis de receptores para IL-1, -2, -6, TNF- $\alpha$ , entre outros, são gerados por “shedding”. Receptores solúveis para a maioria das citocinas e fatores de crescimento já foram detectadas em fluidos humanos. O “shedding” de TNF- $\alpha$ -R-I e -II, IL-6R, TNF- $\alpha$ , FAS-ligante e L-selectinas contribuem de maneira crucial na regulação de reações inflamatórias locais e sistêmicas (SBARBA & ROVIDA, 2002).

No *Trypanosoma cruzi* já foi observado o “shedding” de algumas proteínas celulares como a TC-85 (GONÇALVES et al., 1991), o T-DAF (JOINTER et al., 1988), o antígeno SAPA (AFFRANCHINO et al., 1989), e a SSp4, principal antígeno de superfície de amastigotas (FREVERT, SCHENKMAN & NUSSENZWEIG, 1992), além de alguns membros da família das *trans*-Sialidases (CAMPETELLA et al., 1992; DE TITTO & ARAUJO, 1988). A presença de grande quantidade desta enzima liberada no citoplasma da célula hospedeira pode contribuir para a ruptura da célula e também à uma intensa reação inflamatória local necrosante associada à fase aguda da doença (FREVERT, SCHENKMAN & NUSSENZWEIG, 1992). Também já foi

demonstrada a liberação de cisteíno proteinase por tripomastigotas, no entanto a consequência da sua presença circulante no hospedeiro ainda não é muito clara (YOKOYAMA-YASUNAKA et al., 1994).

A presença de antígenos do parasito em soro humano foi detectada, podendo persistir por meses e até anos após a infecção inicial (ARAÚJO, CHIARI & DIAS, 1981). Estudos mostram que lesões inflamatórias observadas na fase crônica de uma infecção experimental são resultado de uma reação de hipersensibilidade (DHT). Younés-chennoufi e colaboradores (1988) detectaram antígenos do parasito em infiltrados inflamatórios durante a fase crônica, o que pode explicar porque apesar da dificuldade da detecção do parasito nesta fase da doença, existe um aumento no número e no tamanho das lesões inflamatórias observadas. O “shedding” de componentes agregados de membrana também pode ajudar a explicar as alterações imunopatológicas descritas em rim de camundongos infectados com o *T. cruzi* (CASTRO & RIBEIRO DOS SANTOS, 1977).

Estudos anteriores mostraram que anticorpos são capazes de interagir com a superfície do *Trypanosoma cruzi*: anticorpos específicos e não-específicos ou não relacionados (SCHMUÑIS et al., 1978, 1980; MIRANDA-SANTOS & CAMPOS-NETO, 1981; CICARELLI & DANIEL LOPES, 1989). IgGs, específicas contra o *T. cruzi*, isoladas de humanos ou de animais se ligam às formas tripomastigotas e induzem a mobilidade de antígenos de superfície resultando na formação de um “cap” nas regiões anterior e posterior do parasito, num processo dependente do clone ou cepa do parasito, tempo de incubação, temperatura, e inibido pela ação de azida sódica (SCHMUÑIS et al., 1978, 1980). Componentes de membrana agregados reconhecidos

por anticorpos específicos são eliminados da superfície do parasito através de “shedding”, descrito por Gonçalves e colaboradores como um processo espontâneo envolvendo vesiculação da membrana plasmática (GONÇALVES et al., 1991).

## *Objetivos*

---

Este trabalho tem por objetivo, analisar comparativamente a modulação da superfície de *Trypanosoma cruzi* através da observação de alguns aspectos da ligação, endocitose e liberação de receptores entre parasitos pertencentes à cepa Y e aos clones CL-Brener e Dm28c. Para isso foram feitas

- 1) Observação da ligação de imunoglobulinas não específicas à superfície do *Trypanosoma cruzi*, analisando a saturação dos sítios de ligação destas moléculas à superfície de formas epimastigotas e tripomastigotas, além de verificar o efeito da ação de tripsina e fosfolipase C tanto na ligação da IgG como da BSA à superfície do parasito.
- 2) Análise da atividade endocítica de formas epimastigotas do *T. cruzi*, observando a cinética do processo endocítico, o comportamento dos compartimentos da via endocítica em cinética de longa duração, assim como a análise do efeito da ação de inibidor da PI<sub>3</sub>-quinase na endocitose de IgG não específica e de BSA.
- 3) Observação do processo de liberação de moléculas da superfície em formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, analisando a regulação deste processo em formas tripomastigotas pertencentes a diferentes cepas e clones do parasito.



## ***Materiais e Métodos***

---

### 3.1. Obtenção dos parasitos

A cepa Y, isolada de um caso agudo humano de Doença de Chagas (Silva e Nussensweig, 1953), e os clones CL-Brener (Zingales et al., 1997) e Dm28c (Contreras et.al., 1988) do *Trypanosoma cruzi*, foram utilizados.

Formas tripomastigotas de cultura (TCT) foram obtidas a partir do sobrenadante de células LLC-MK<sub>2</sub> (linhagem de células epiteliais isoladas a partir de rins de macacos Rhesus, ATCC, Rockville, MD/USA) infectadas. Tripomastigotas foram purificados através de uma centrifugação a 400 x g durante 5 minutos para que ficassem livres de formas amastigotas e de restos celulares das células LLC-MK<sub>2</sub>. O tubo contendo os parasitos é mantido a 37° C durante cerca de 2 horas para que os tripomastigotas que eventualmente se encontrem no pellet de células, retornem ao sobrenadante. Após este período o sobrenadante é centrifugado a 1000 x g durante 10 minutos para que os tripomastigotas purificados sejam concentrados.

As formas epimastigotas da cepa Y e dos clones CL-Brener e Dm28c, foram mantidas a 28<sup>0</sup>C em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células utilizadas foram obtidas a partir do 3<sup>o</sup> ou 4<sup>o</sup> dia de cultivo, quando estão em sua fase logarítmica de crescimento.

### 3.2. Obtenção e infecção de células hospedeiras

Célula LLC-MK<sub>2</sub> foram cultivadas em garrafas de cultura (Corning), de 25 ou 75 cm<sup>2</sup>. Para o repique das culturas, as células foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada (PBS), pH 7,2 – 7,4, e incubadas em solução de tripsina ( 0,5g, 1:250-DIFCO suplementada com 0,05g de EDTA) durante 1 minuto. Após este período a solução de

tripsina foi removida e as células foram ressuspensas, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, em meio de cultura RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Uma vez soltas, as células foram transferidas para novas garrafas de cultura e mantidas em meio RPMI-1640 acrescido com 10% de SFB, a 37<sup>0</sup>C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A troca do meio de cultura das células foi realizada a cada 48h. Algumas garrafas foram infectadas com formas tripomastigotas numa relação parasito:célula hospedeira de 10:1 e mantidas a 37<sup>0</sup>C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI-1640 acrescido com 2% de SFB por aproximadamente 5 dias quando o ciclo intracelular do parasito se completa e já é possível obter formas tripomastigotas livres no sobrenadante.

### **3.3. Reagentes**

A análise dos receptores para a porção Fc de imunoglobulinas foi realizada através da utilização de imunoglobulinas do tipo G (IgGs) não-específicas. Entre estas estão as IgG de cabra anti-IgG humana, coelho ou camundongo, conjugadas à fluoresceína (IgG-FITC), rodamina (IgG-TRITC) (Sigma, USA), Alexa Fluor-488 (IgG-Alexa 488) ou Alexa Fluor-546 (IgG-Alexa 546) (Molecular Probes, USA) ou complexadas a partículas de ouro coloidal (IgG-Au, 10nm, BB International). Imunoglobulinas G de coelho também foram utilizadas em alguns experimentos (gentilmente cedidas pelo Laboratório Hertha Meyer). Soro de paciente chagásico foi utilizado como fonte de Igs específicas. Albumina bovina (BSA) também foi utilizada, pura ou conjugada à Alexa Fluor 488 (BSA-Alexa 488) (Molecular Probes, USA), ou à fluoresceína (BSA-FITC), além de Lucifer Yellow (LY), Concanavalina A (Con A) e Ferritina cationizada (FeCat) (Sigma, USA).

Para análise da regulação do processo de “shedding”, foram utilizados azida sódica, 2-deoxy-glicose, 13-acetato de forbol 12-miristato (PMA) e 1,10 fenantrolina (Sigma, USA).

#### **3.4. Tratamentos enzimáticos**

Para se observar as características de ligação de IgG não específica e BSA à superfície de formas tripomastigotas ou epimastigotas,  $5 \times 10^6$  células da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidas conforme descrito em 3.1, lavadas em meio RPMI sem SFB e incubadas na presença de inibidores da síntese de ATP (azida sódica 0,01% e 2-deoxiglicose 50nM) durante 30 minutos a 37° ou 28°C para tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente. Em seguida os parasitos tratados com 500µg/ml de tripsina (tipoX - Sigma, USA) em meio RPMI, para retirada de receptores presentes na membrana plasmática, durante 15 minutos a 37°C ou 1U/ml de fosfolipase C (PIPL-C) (*Bacillus thuringiensis* – Sigma, USA) em meio RPMI, para retirada de receptores ancorados via âncoras de GPI, durante 1 hora a 28°C ou 37°C, para epimastigotas ou tripomastigotas, respectivamente. Em seguida as células foram lavadas em RPMI sem SFB e incubadas novamente em meio RPMI na presença dos inibidores da síntese de ATP e de 5 µg/ml de IgG-FITC ou BSA-FITC a 4°C durante 30 minutos.

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

### 3.5. Experimentos de ligação e saturação

Para se observar as características de ligação e saturação de ligantes a superfície das formas tripomastigotas ou epimastigotas,  $5 \times 10^6$  células de cada uma das amostras de *T. cruzi* foram obtidas conforme descrito em 3.1., lavadas em meio RPMI sem SFB e incubadas na presença de inibidores da síntese de ATP (azida sódica 0,01% e 2-deoxiglicose 50nM) durante 30 minutos a 37° ou 28°C para tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente. Em seguida os parasitos foram incubados na presença de IgG não específica conjugada à fluoresceína (IgG-FITC) em concentrações variando entre 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70µg/ml a 4°C durante 30 minutos. Experimentos sob as mesmas condições também foram realizados com BSA-Alexa Fluor488.

Para observar a possibilidade de um deslocamento da curva gerado pela competição dos sítios de ligação, os experimentos de ligação foram realizados na presença de IgG e BSA não-conjugadas a fluorocromos em uma concentração 5x maior que a concentração de saturação para cada um dos ligantes. No caso da IgG, a molécula não marcada foi obtida a partir do conjugado previamente quelado com brometo de etídio 1mg/ml por 30 minutos a 4°C. Já a BSA foi adquirida sem marcação (Sigma, USA).

Todas as amostras foram analisadas por citometria de fluxo.

### 3.6. Avaliação da atividade endocítica de epimastigotas frente a BSA e IgG

Formas epimastigotas pertencentes a cepa Y e aos clones CL-Brener e Dm28c ( $5 \times 10^6$  células) obtidas conforme descrito em 3.1., foram lavadas em meio LIT sem SFB e incubadas na presença de 5µg/ml LY, BSA-Alexa488, IgG-FITC ou IgG-Alexa488 a 28°C em meio LIT sem soro durante períodos variando entre 15 a 180 minutos. Após

cada tempo de incubação as células foram centrifugadas a 3000 x g durante 4 minutos e processadas para análise por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência. Algumas amostras foram pré-tratadas com 3 $\mu$ M de LY294002, um análogo de quercetina inibidor específico de PI 3-quinase, durante 1 hora a 28°C. Em seguida estas células foram incubadas em presença de 5 $\mu$ g/ml BSA-FITC ou IgG-FITC a 28°C durante períodos de 15 a 240 minutos e então processadas para análise por citometria de fluxo.

Experimentos de pulso e caça foram também realizados com formas epimastigotas da cepa Y (5 x 10<sup>6</sup> células) obtidas conforme descrito em **3.1.** As células foram lavadas e ressuspensas em meio LIT sem SFB e incubadas na presença de 20 $\mu$ g/ml de IgG-TRITC por um pulso de 4 horas a 28°C. Após este período as células foram lavadas em meio LIT sem SFB para remoção das IgGs não endocitadas e incubadas em meio LIT suplementado com 10% de SFB por tempos de 24, 48 ou 72 horas e processadas para observação por microscopia de fluorescência.

Experimentos de pulso e caça foram também processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Formas epimastigotas pertencente a cepa Y (5 x 10<sup>6</sup> células) obtidas conforme descrito em **3.1.** foram lavadas e ressuspensas em meio LIT sem SFB e incubadas na presença de 20 $\mu$ g/ml IgG-Au a 28°C por um pulso de 4 horas a 28°C. Após este período as células foram lavadas em meio LIT sem SFB para remoção das IgGs não endocitadas e incubadas em meio LIT suplementado com 10% de SFB por tempos de 24, 48 ou 72 horas.

### **3.7. Avaliação do “shedding” de componentes de superfície do *T. cruzi* sob influência de diferentes moléculas**

Para a análise deste fenômeno, três estratégias de estudo foram utilizadas: a citometria de fluxo e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Para avaliação do processo de “shedding” por citometria de fluxo, formas tripomastigotas ( $5 \times 10^6$  células) foram lavadas em meio RPMI-1640 sem soro e incubadas na presença de IgG-Alexa 488  $60\mu\text{g/ml}$ , soro de paciente chagásico 1:50, IgG de coelho  $10\mu\text{g/ml}$ , durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida as células foram lavadas mais uma vez em meio sem soro e incubadas novamente, agora a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 ou 30 minutos. Nas amostras incubadas na presença de IgGs específicas, após a incubação a  $37^\circ\text{C}$ , os parasitos foram lavados e fixados com formaldeído 2% em tampão fosfato 0,1M durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e incubados na presença de IgG de cabra anti-IgG humana conjugada à Alexa Fluor 546, 1:32 concentração final, por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas e ressuspensas em PBS, pH 7,2, contendo 0,1% de azida sódica (tampão de FACS).

Algumas substâncias foram testadas a fim de observar uma possível interferência neste processo. Para detectarmos a influência de ATP no processo de “shedding”, algumas amostras foram previamente incubadas na presença de inibidores da síntese de ATP (azida sódica 0,01% e 2-deoxiglicose 50nM) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e durante a execução do experimento. A influência da ativação de proteína quinase C (PKC) e a participação de metaloproteases no processo de “shedding” foram avaliados com a utilização de acetato de forbol miristato (phorbol-12-myristate-13-acetate - PMA) e de um inibidor de metaloprotease (1, 10 fenantrolina), respectivamente. Para isto os

parasitos foram pré-incubados com PMA (100ng/ml) ou 1, 10 fenantrolina (5mM) durante 1 hora a 37°C e durante a execução do experimento como previamente descrito. Após esta etapa as amostras foram processadas para análise por citometria de fluxo.

Epimastigotas ( $5 \times 10^6$  células) foram lavados em meio LIT sem SFB e incubados na presença de Concanavalina-A-FITC (Con-A-FITC) 5µg/ml ou IgG-Alexa Fluor-488 40µg/ml durante 30 minutos a 4°C. As células foram então lavadas uma vez em LIT sem soro e incubadas novamente a 28°C por 15 ou 30 minutos antes de serem lavadas e ressuspensas em tampão FACS.

Para avaliação do processo de “shedding” por microscopia eletrônica, formas tripomastigotas foram submetidas às mesmas condições experimentais já descritas anteriormente e incubadas em presença de soro de paciente chagásico 1:50, IgG de coelho 10µg/ml, Con-A 10µg/ml ou FeCat 10µg/ml.

### **3.8. Citometria de Fluxo**

Todas as amostras destinadas à análise por citometria de fluxo, após cada um dos experimentos já previamente descritos foram lavadas em PBS, pH 7,2, contendo 0,1% de azida sódica (tampão de FACS) e analisadas no mesmo tampão em um aparelho FACScan (Becton Dickinson). O aparelho foi padronizado para análise de  $3 \times 10^4$  células por amostra.

### **3.9. Microscopia de fluorescência**

Células destinadas à análise por microscopia de fluorescência, após incubação específica de cada experimento foram lavadas em PBS e fixadas com 4% de formaldeído



em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2, durante 10 minutos a 4°C. Os parasitos foram então aderidos por 15 minutos, a temperatura ambiente, em lamínulas de vidro previamente recobertas com poli-L-lisina. Para recobrir as lamínulas, as mesmas devem permanecer em contato com uma solução de poli-L-lisina a 0,1% em PBS por 15-20 minutos a temperatura ambiente. Após este período a poli-L-lisina é removida com uma pipeta Pasteur e a lamínula lavada em PBS ou água, ambos filtrados em filtros Millipore 0,22µm. Após adesão dos parasitos, as lamínulas foram lavadas por 2x em PBS e montadas sobre lâminas com uma solução de glicerol : PBS (9:1) contendo 0,2N n-propil-galato para evitar o decaimento da fluorescência. Os resultados foram observados em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan 2 equipado com uma câmera “Color ViewXS” e confocal Zeiss LSM 310.

### **3.10. Microscopia eletrônica**

#### **3.10.1. Microscopia Eletrônica de Varredura**

As amostras foram lavadas em PBS, e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, contendo 3,7% de sacarose durante 1 hora a temperatura ambiente. Após fixadas as células são lavadas em PBS e aderidas em lamínulas de vidro previamente recobertas com poli-L-lisina conforme descrito na seção 3.8. Após adesão as lamínulas foram lavadas em PBS e pós-fixadas durante 30 minutos em solução de tetróxido de ósmio a 1% em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo 0,8 % de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio. As amostras são então lavadas em PBS, e desidratados em séries crescentes de etanol de 15 até 95% e em mais duas etapas de desidratação em etanol absoluto. Todas as etapas de desidratação foram realizadas

durante 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico em CO<sub>2</sub> em aparelho BAL-TEC CPD030 e as lamínulas de vidro foram montadas sobre suportes de alumínio com cola de prata e metalizadas com uma camada de 20nm de ouro pelo método de “sputtering” em aparelho Balzers Union FL-9496. A observação foi feita em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310.

### **3.10.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As amostras foram lavadas em PBS e fixadas em formaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, contendo 3,7% de sacarose durante 1 h em temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavados duas vezes em PBS e pós-fixados durante 1 h, no escuro, em solução de tetróxido de ósmio a 1% em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo 0,8 % de ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio. As amostras foram, então, lavadas 2 vezes em PBS, incubadas em acetona 50% durante 10 minutos e posteriormente contrastadas em bloco, em uma solução de acetato de uranila 2% em acetona 50%, durante 2 h no escuro. Após a contrastação em bloco, a desidratação prosseguiu em séries crescentes de acetona 70 e 90% e em mais duas etapas de acetona absoluta. Todas as etapas de desidratação foram realizadas durante 10 minutos a 4° C. As amostras foram, então, infiltradas em resina epoxi Poly-Bed diluída 1:1 em acetona absoluta e, posteriormente, em resina Poly-Bed pura. Em ambas as etapas as amostras permaneceram a temperatura ambiente durante 24 h. Após este período foi feita a inclusão das amostras em moldes de borracha ou silicone, que permaneceram durante 72 h a 60° C para que a resina fosse polimerizada. Secções ultrafinas foram obtidas em ultramicrotomos LKB, M6000XL ou Reichert, Ultracut F e colhidas em grades de cobre de 300 mesh. As grades foram contrastados em uma solução aquosa de acetato de uranila

5% durante 60 minutos, lavados em água e, em seguida, incubados em citrato de chumbo (Reynolds, 1963) durante 5 minutos. Uma vez seco, o material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS 900 ou FEI MORGANI 268F sob voltagem de aceleração de 80Kv.

### **3.11. Análises estatísticas**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e tiveram o seu desvio padrão calculados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste T através do programa “OriginLab. OriginPro”, versão 7.5.

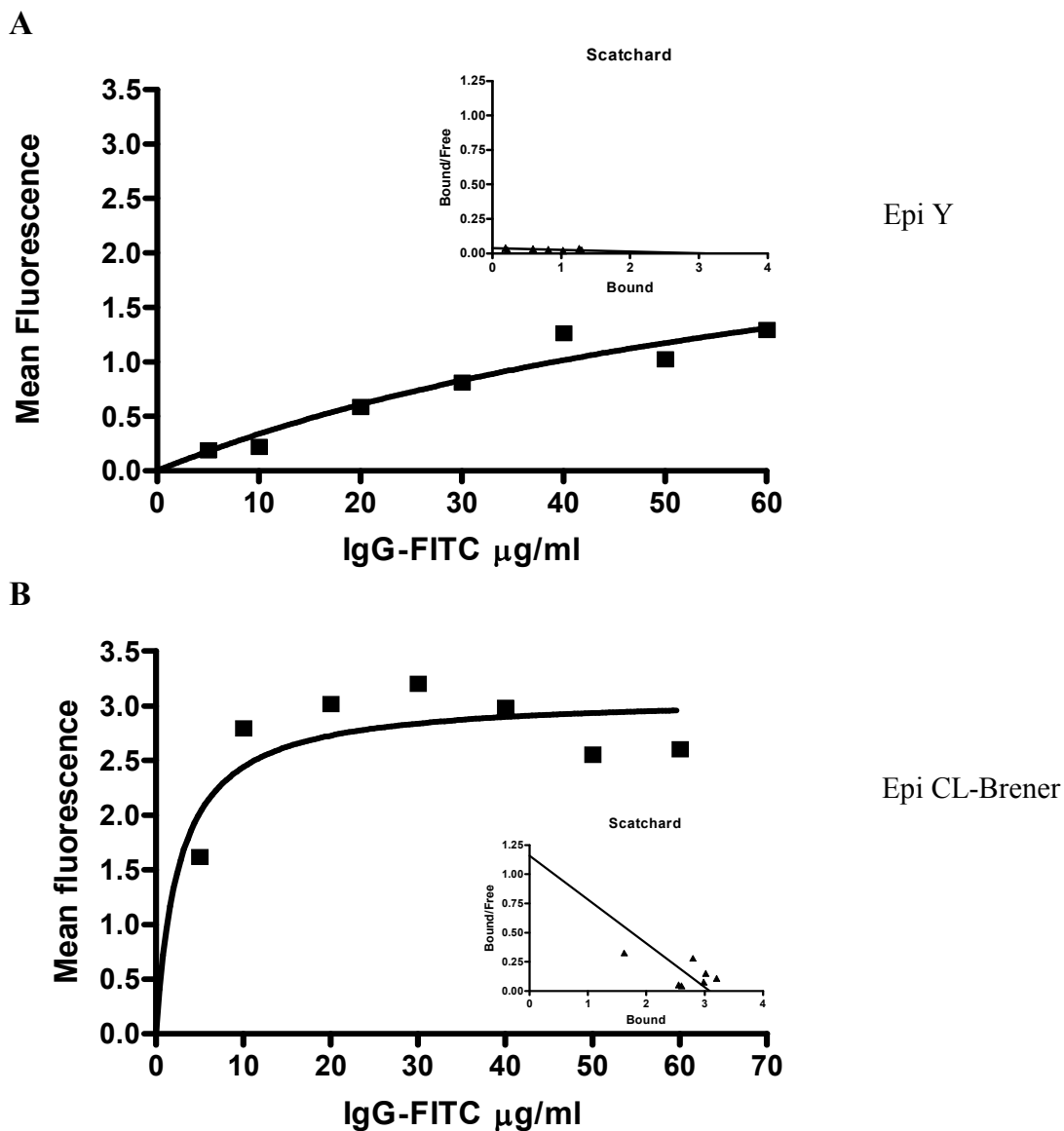
## *Resultados*

---

#### 4.1. Ligação de imunoglobulinas não-específicas à superfície do *T. cruzi*.

##### 4.1.1. Saturação dos sítios de ligação de IgG não-específica à superfície de epimastigotas.

Analizamos por citometria de fluxo, a ligação de IgG não-específica à superfície de epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Um número fixo de formas epimastigotas ( $5 \times 10^6$  parasitos) foi previamente depletados de ATP e mantidos à 4°C, em seguida foram incubados por 30 minutos na presença de IgG-FITC. Nos resultados obtidos foi possível observar uma curva com perfil de saturação na concentração de 40µg/ml (dado não mostrado). No intuito de confirmarmos que esta ligação estava ocorrendo de maneira específica, algumas amostras foram incubadas sob as mesmas condições mencionadas anteriormente na presença de 5 vezes a concentração de saturação (200µg/ml) de IgG previamente quelada com brometo de etídeo (como descrito no item 3.5). O resultado obtido nos mostrou uma curva com perfil similar, no entanto deslocada para baixo, indicando a competição pelos sítios de ligação de IgG (dado não mostrado). A subtração das curvas obtidas está representada na Fig. 3A. Análise pelo método Scatchard indicou um KD aparente de  $5,45 \times 10^{-7}$  M, um valor que indica a presença de receptores para IgG não-específicas com afinidade que pode ser considerada de um receptor específico. Formas epimastigotas pertencentes ao clone CL-Brener (**Fig. 3B**) também foram analisadas. Na presença de IgG-FITC, a saturação dos sítios de ligação foi obtida na concentração de 30µg/ml. No caso de formas epimastigotas pertencentes ao clone CL-Brener, os experimentos de competição foram realizados com 150µg/ml da IgG-FITC quelada. O KD obtido neste caso foi de  $1,8 \times 10^{-8}$  M, sugerindo não só a presença de receptores para IgG não-específicas, como uma afinidade bem maior

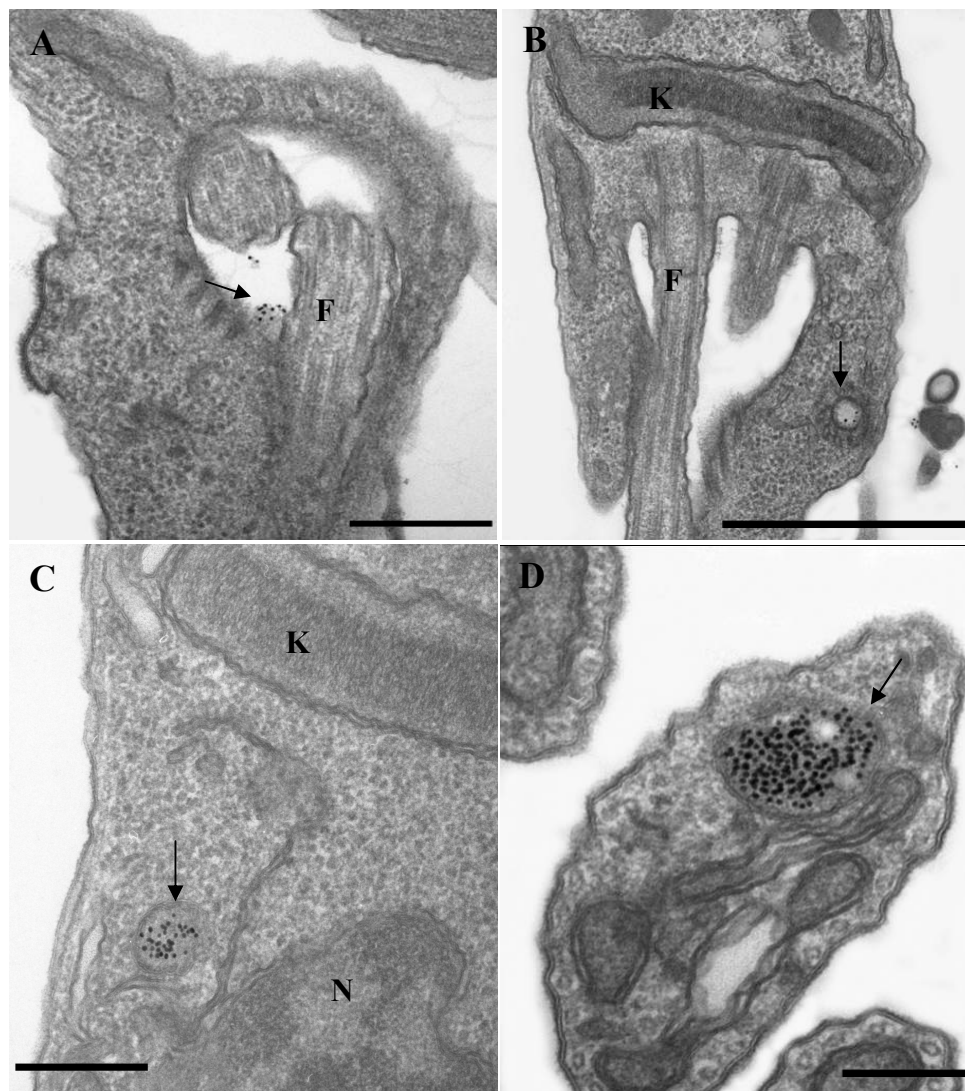


**Figura 3: Ligação de IgG não-específica à superfície de epimastigotas do *T. cruzi*.** Os gráficos representam a subtração entre curvas obtidas em experimentos de saturação e competição dos sítios de ligação de IgG não-específicas (cabra anti-coelho) em formas epimastigotas pertencentes à cepa Y (**A**) ou ao clone CL-Brener (**B**) e são expressos como intensidade de fluorescência versus concentração de IgG-FITC; Análises pelo método Scatchard (**inserts**) indicam um KD de  $5,45 \times 10^{-7}$  M na cepa Y e no caso do clone CL-Brener (**B**) de  $1,8 \times 10^{-8}$  M, indicando a presença de receptores para IgGs não-específicas de maior afinidade em formas epimastigotas do clone CL-Brener.

destes receptores em relação à molécula de IgG quando comparado aos receptores presentes na cepa Y.

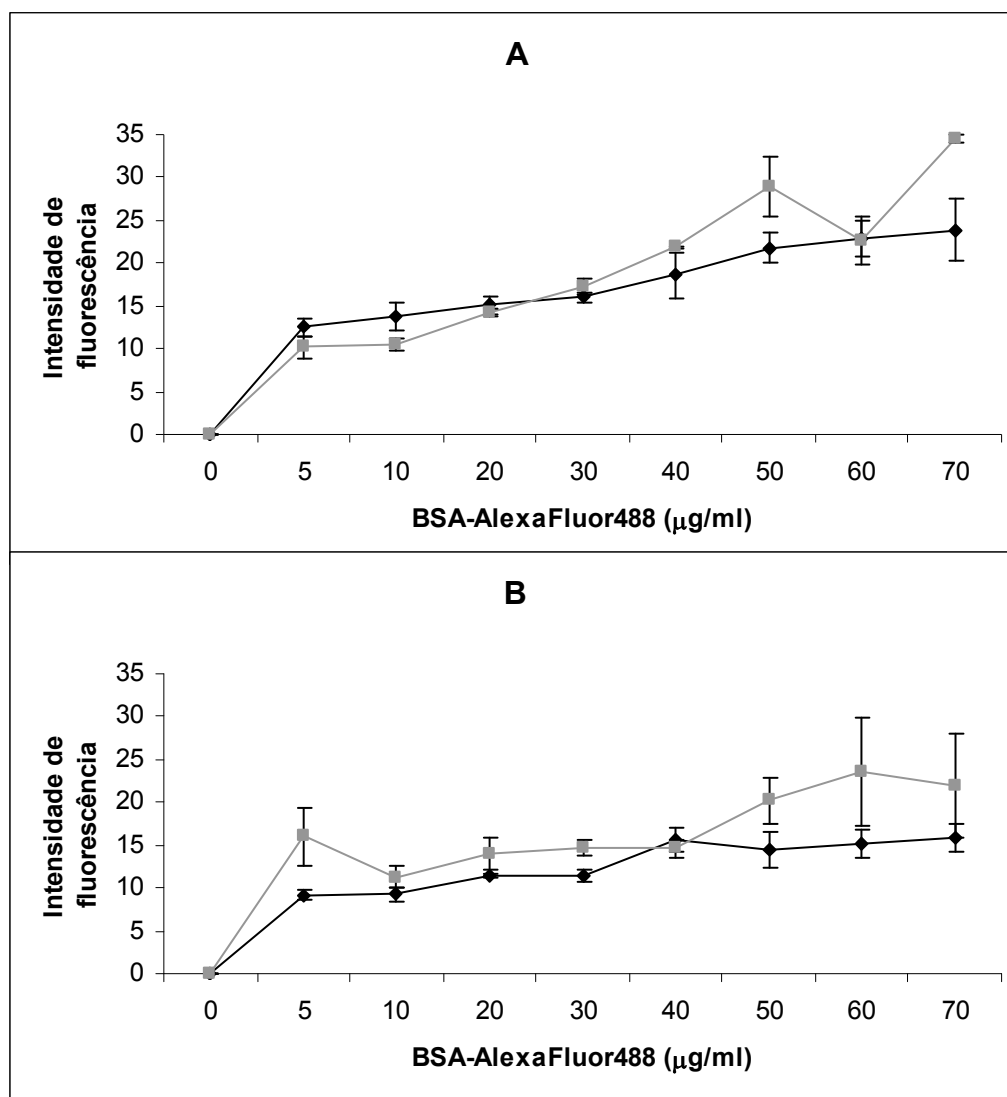
Em imagens obtidas a partir de análise através de microscopia eletrônica de transmissão, epimastigotas da cepa Y incubados a 4°C na presença de IgG-Au (20µg/ml) durante 30 minutos observamos partículas de ouro coloidal na membrana da bolsa flagelar assim como na membrana do flagelo (dados não mostrados). A marcação com ouro coloidal é detectada também na entrada e no interior da bolsa flagelar (**Fig. 4A**). À baixa temperatura o processo endocítico não passa dos passos iniciais, sendo comum encontrar marcação no interior do citóstoma (**Fig.4B, D**) e da citofaringe que pode se prolongar até a região mais próxima do núcleo (**Fig. 4C**).

Apesar de a BSA ser descrita como uma molécula utilizada em estudos da via endocítica de fase fluida realizamos experimentos sob as mesmas condições já descritas anteriormente na presença de BSA-Alexa Fluor 488, para observarmos a possibilidade da ligação desta molécula a receptores presentes no parasito (**Fig. 5**). Curiosamente, a curva obtida a partir da análise destas amostras também mostrou um perfil de saturação na concentração de 50µg/ml, tanto em epimastigotas da cepa Y (**Fig. 5A**) como do clone CL-Brener (**Fig. 5B**). No entanto, quando experimentos foram realizados juntamente com BSA sem qualquer marcação (250µg/ml), o deslocamento da curva não foi detectado, sugerindo que a marcação da superfície de formas epimastigotas ocorre principalmente devido à adsorção de moléculas de BSA à superfície destas células.



**Figura 4: Ligação de IgG-Au em formas epimastigotas da cepa Y após incubação.** O que se observa nas formas epimastigotas incubadas durante 30 minutos a 4°C em presença de 20 µg/ml de IgG-Au (anti-mouse ou – humano), são partículas de ouro coloidal ligadas na entrada e no interior da bolsa flagelar (**A, seta**). À baixa temperatura o processo endocítico não passa dos passo iniciais, sendo comum encontrar marcação no interior do citóstoma e citofaringe (**B-D, setas**). Em alguns cortes podemos observar inclusive uma imagem de citofaringe localizada em região mais próxima do núcleo (**C, seta**). F, flagelo; K, cinetoplasto; N, núcleo. As barras correspondem a 0,2µm.

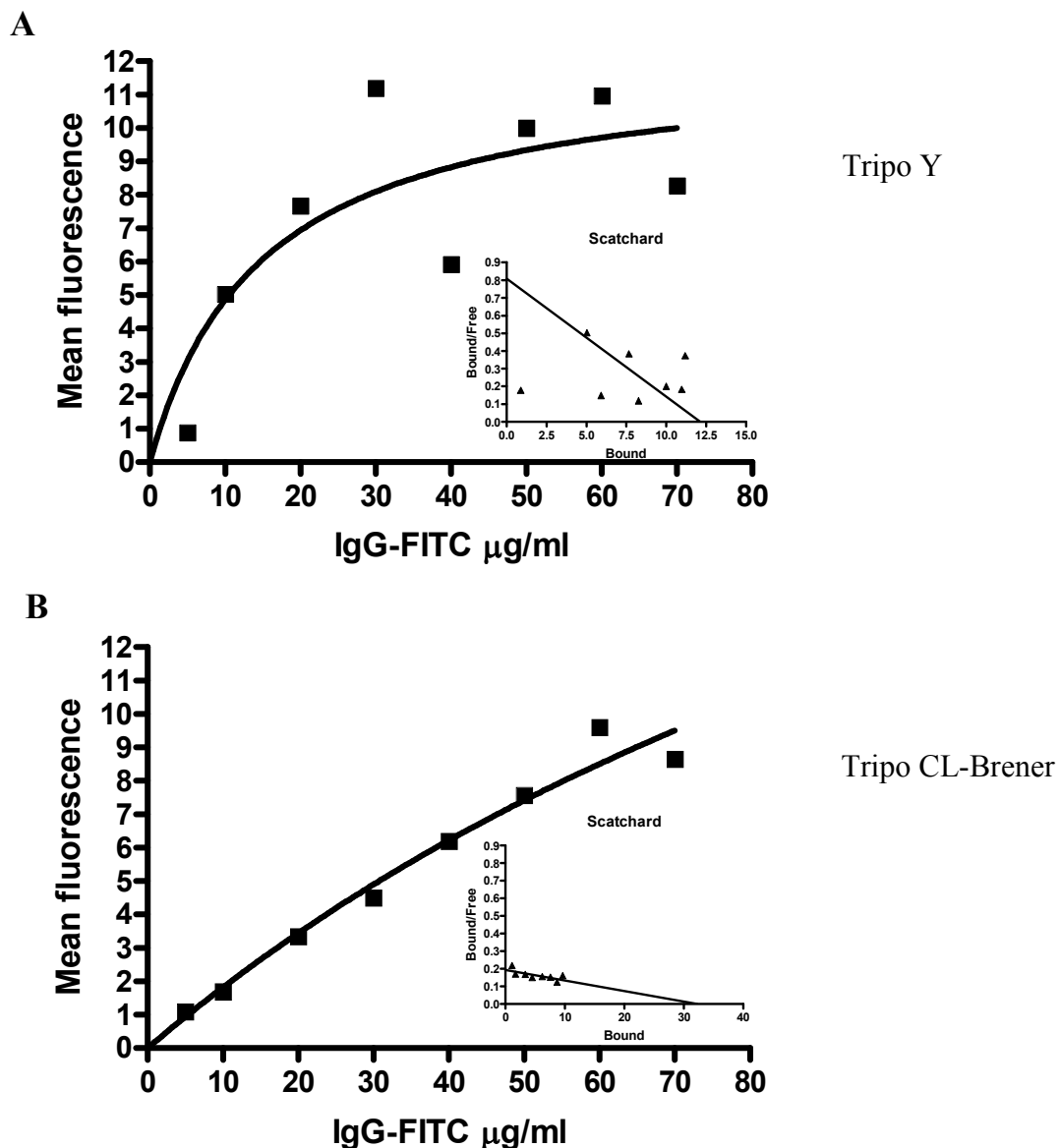




**Figura 5: Ligação de BSA à superfície de epimastigotas do *T. cruzi*.** Epimastigotas pertencentes à cepa Y (A) ou ao clone CL-Brener (B) incubados na presença de diferentes concentrações de BSA-Alexa Fluor488 revelaram um aumento na intensidade de fluorescência até a concentração de 50µg/ml, quando a saturação dos sítios de ligação pôde ser observada (◆-BSA-Alexa Fluor488); experimentos realizados com a adição de 5 vezes a concentração de saturação de BSA não marcada, não mostraram um deslocamento na curva de intensidade de fluorescência (■- + 200µg/ml de BSA não marcada), indicando que a ligação de BSA não ocorre de maneira específica na superfície de formas epimastigotas, sejam elas pertencentes à cepa Y ou ao clone CL-Brener. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão.

#### 4.1.2. Saturação de sítios de ligação de IgG não-específica à superfície de tripomastigotas

A ligação de IgG não-específica à superfície de tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* também foi analisada através da técnica de citometria de fluxo (**Fig. 6**). Formas tripomastigotas ( $5 \times 10^6$  parasitos) foram igualmente depletadas de ATP e incubadas a baixa temperatura durante 30 minutos em presença de IgG-FITC em diferentes concentrações. Foi possível detectar um perfil de saturação na concentração de  $30 \mu\text{g/ml}$  (dado não mostrado). Em experimentos realizados em presença de IgG-FITC, juntamente com 5 vezes a concentração de saturação ( $150 \mu\text{g/ml}$ ) de IgG previamente quelada com brometo de etídio, foi possível observar um deslocamento significativo na curva de intensidade de fluorescência, indicando a existência de uma competição pelos sítios de ligação de IgG. A subtração das curvas obtidas está representada na Fig. 6A. Análise pelo método Scatchard indicou um KD aparente de  $1,5 \times 10^{-8}$  M, um valor que indica a presença de receptores para IgG não-específicas com afinidade que pode ser considerada de um receptor específico. Quando formas tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener foram submetidas às mesmas condições já descritas e analisadas através da citometria de fluxo, a saturação da ligação de IgG-FITC também pôde ser observada, só que na presença de  $60 \mu\text{g/ml}$  de IgG-FITC. O deslocamento da curva também pôde ser observado após a incubação deste clone em experimentos realizados com IgG-FITC e  $300 \mu\text{g/ml}$  de IgG previamente quelada. O KD obtido neste caso foi de  $1,1 \times 10^{-6}$  M. Apesar da presença de receptores para IgG não-específicas, estes receptores possuem uma afinidade bem menor em relação à molécula de IgG quando comparado aos receptores presentes na cepa Y.

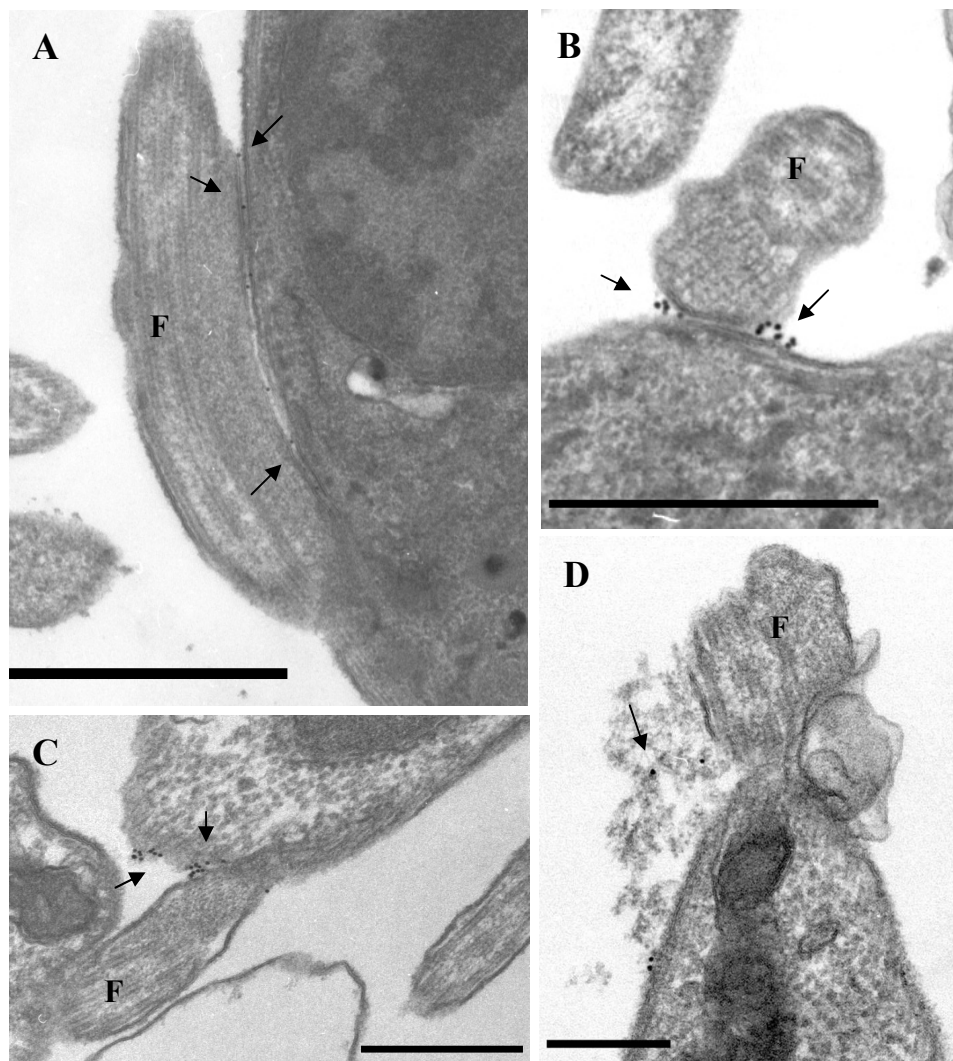


**Figura 6: Ligação de IgG não-específica à superfície de tripomastigotas do *T. cruzi*.** Os gráficos representam a subtração entre curvas obtidas em experimentos de saturação e competição dos sítios de ligação de IgG não-específicas (cabra anti-coelho) em formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y (**A**) ou ao clone CL-Brener (**B**) e são expressos como intensidade de fluorescência versus concentração de IgG-FITC; Análises pelo método Scatchard (**inserts**) indicam um KD de  $1,5 \times 10^{-8}$  M na cepa Y e no caso do clone Cl-Brener (**B**) de  $1,1 \times 10^{-6}$  M, indicando a presença de receptores para IgGs não-específicas de maior afinidade em formas tripomastigotas da cepa Y.

A análise por microscopia eletrônica de transmissão de formas tripomastigotas da cepa Y, permitiu a observação da localização dos sítios de ligação de IgG após incubação dos parasitos durante 30 minutos a 4°C. Esta análise mostrou várias partículas de ouro coloidal localizadas principalmente na região de adesão entre o flagelo e a membrana do corpo celular (**Figs. 7A-C**). Algumas formas intermediárias apresentaram também partículas de ouro coloidal no interior da bolsa flagelar (dados não mostrados).

#### **4.1.3. Efeito do tratamento com tripsina e fosfolipase C na ligação de IgG não-específica à superfície de epimastigotas e tripomastigotas**

A ligação de imunoglobulinas não-específicas em *T. cruzi*, ocorre através de receptores específicos presentes na superfície do parasito, capazes de reconhecer as porções Fc de imunoglobulinas do tipo G (IgGs) (Campos-Neto et al., 2003). A ligação destes receptores à superfície dos parasitos foi analisada quanto sua natureza através da análise de amostras tratadas por 15 minutos com 500µg/ml de tripsina ou durante 1 hora com 1U/ml de PIPL-C. Resultados obtidos através da análise de citometria de fluxo mostraram que após o tratamento com a tripsina houve uma redução de 62,3% na ligação de IgG à superfície das formas epimastigotas da cepa Y (**Fig. 8A**). Quando estas células foram tratadas com a PIPL-C, a ligação de IgG-FITC caiu em 37,9% (**Fig. 8B**), dando evidências de que esta ligação pode ocorrer através de proteínas ancoradas à membrana citoplasmática via âncoras de GPI. Quando experimentos sob as mesmas condições foram realizados com tripomastigotas, foi possível observar um aumento na ligação de IgG-FITC de 75% nas



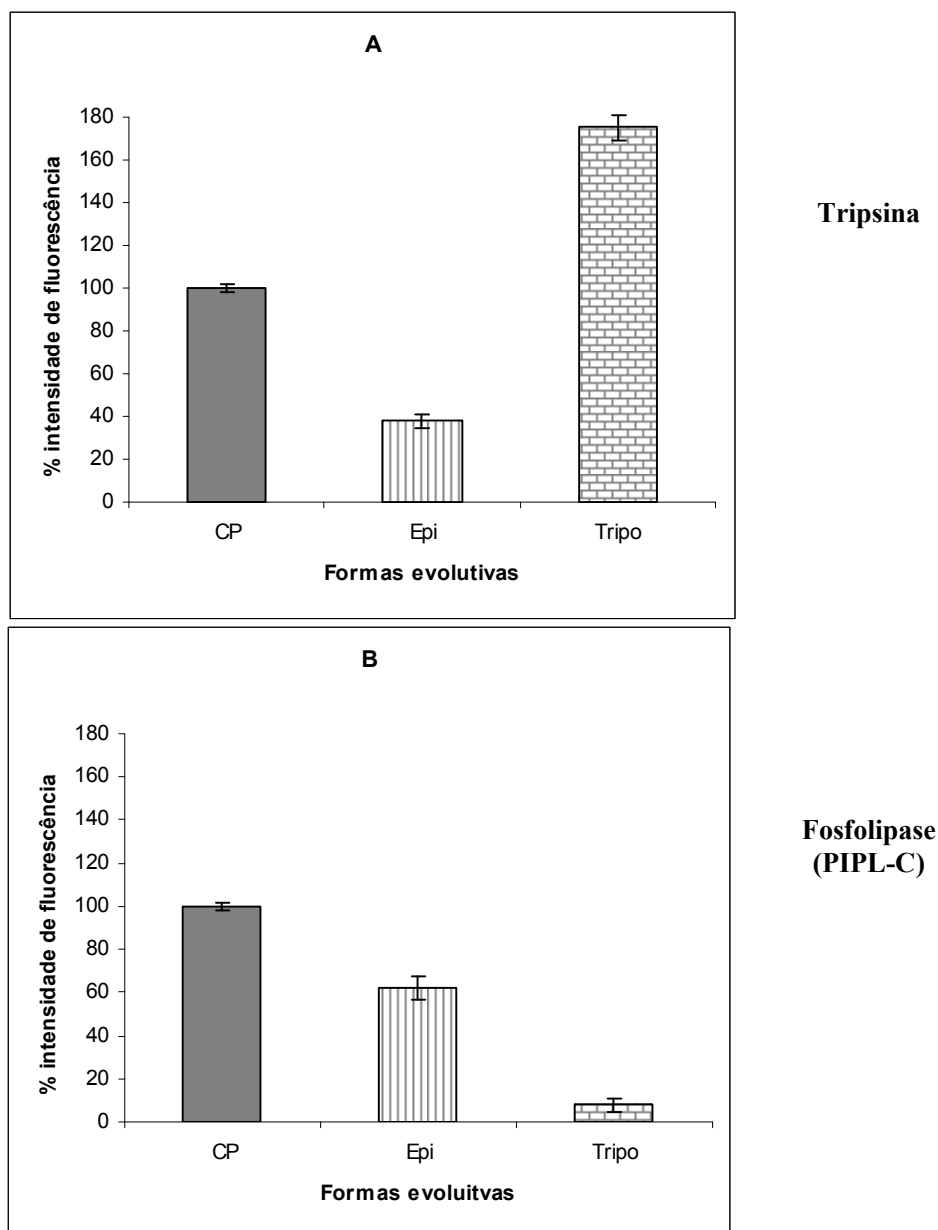
**Figura 7: Ligação de IgG-Au em formas tripomastigotas da cepa Y.** Tripomastigotas foram incubadas durante 30 minutos a 4°C em meio RPMI sem soro contendo 20µg/ml de IgG-Au (anti-mouse ou -humano), complexados à partículas de ouro coloidal de 10nm de diâmetro. As partículas de ouro se localizam preferencialmente na região de adesão do flagelo ao corpo celular (A-C, setas) assim como associado a material amorfo próximo à superfície celular (D, seta). As barras de aumento correspondem a 0,3µm.

células tratadas com tripsina (**Fig. 8A**), enquanto após o tratamento com PIPL-C esta ligação foi 92,3% menor (**Fig. 8B**), indicando portanto que nestas formas evolutivas a ligação de IgG ocorre principalmente através de receptores associados à membrana citoplasmática via âncoras de GPI e que, a tripsinização de alguma forma revela sítios de ligação à IgG mais próximos à superfície celular.

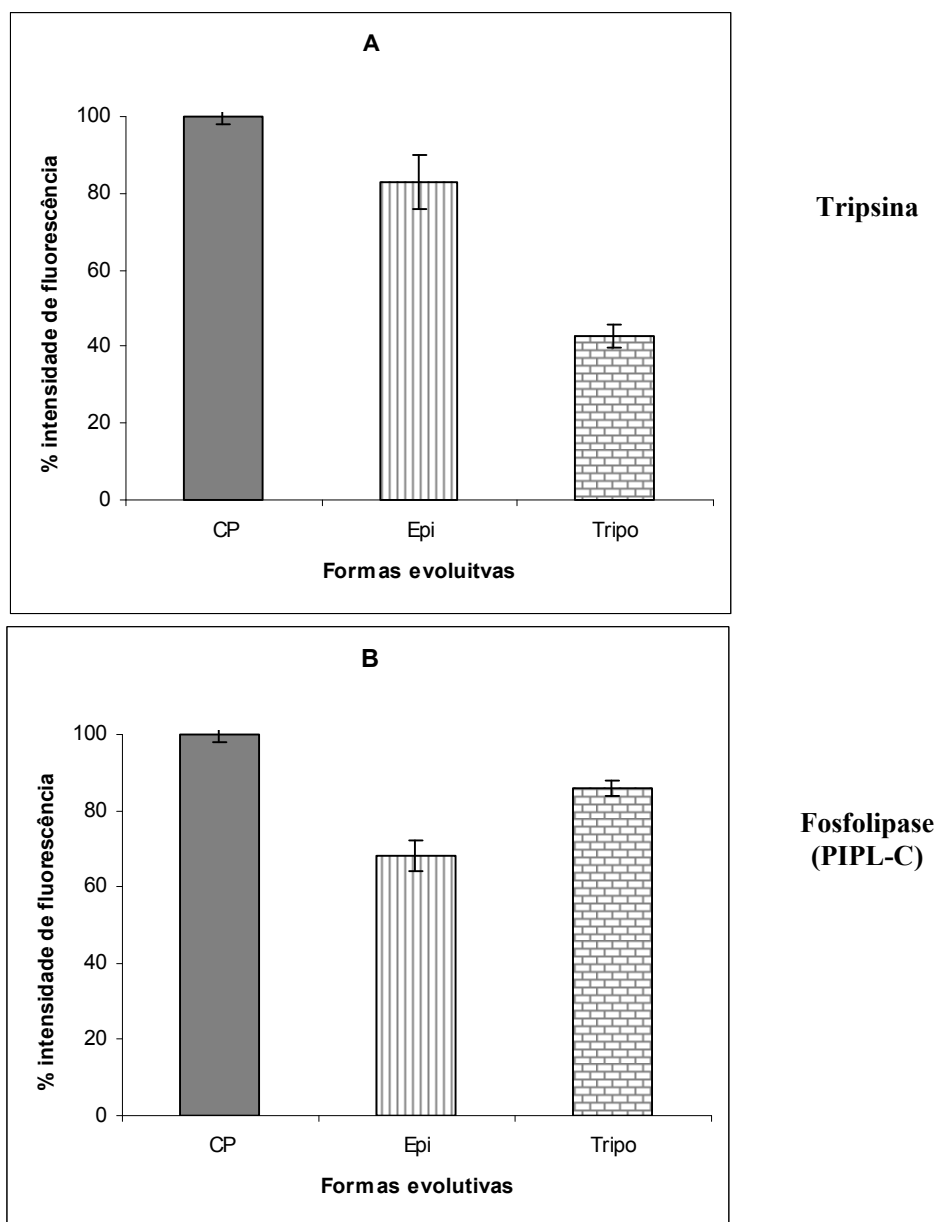
#### **4.1.4. Efeito do tratamento com tripsina e fosfolipase C na ligação de BSA à superfície de epimastigotas e tripomastigotas**

Os resultados obtidos em epimastigotas submetidos à incubação durante 30 minutos a 4°C em presença de BSA-FITC após tratamento com 500µg/ml de tripsina, nos mostrou uma redução da fluorescência destas células de 17,2% (Fig. 9A). Após o tratamento com PIPL-C, esta redução foi maior (31,8%) (Fig. 9B) apontando para o fato de que esta ligação ocorre principalmente através de moléculas associadas à membrana citoplasmática via âncoras de GPI. Ao contrário do que foi observado em formas epimastigotas, a ligação de BSA às formas tripomastigotas foi reduzida em 57,4% da fluorescência (Fig. 9A) após o tratamento com tripsina e em 14,3% após a PIPL-C (Fig. 9B), indicando que no caso destas formas evolutivas a ligação de BSA à superfície celular ocorre em sua maior parte através de moléculas presentes na membrana citoplasmática principalmente não ancorados à membrana citoplasmática.

Uma quadro resumido das alterações provocadas pelo tratamento de tripsina e fosfolipase C na ligação de BSA e IgGs não-específicas à superfície das formas epimastigotas e tripomastigotas pode ser observado na Tabela I.



**Figura 8:** Efeito da tripsina e da fosfolipase C na ligação de IgG não-específica sobre a superfície de epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*. Após o tratamento com 500 $\mu$ g/ml de tripsina (tipo X) durante 15 minutos a 37°C (**A**), as formas epimastigotas (Epi) da cepa Y, mostraram uma diminuição da intensidade de fluorescência mais acentuada do que após o tratamento com 1U/ml de PIPL-C (*Bacillus thuringiensis*) durante 1 hora a 28°C (**B**); por outro lado, em formas tripomastigotas (Tripo), a redução da ligação IgG-FITC à superfície celular foi significativamente reduzida após o tratamento com a PIPL-C (**B**). O tratamento com tripsina promoveu um aumento na ligação de IgG-FITC (**A**). Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão. (CP, controle positivo)



**Figura 9:** Efeito da tripsina e da fosfolipase C na ligação de BSA sobre a superfície de epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*. Após o tratamento com 500 $\mu$ g/ml de tripsina (tipo X) durante 15 minutos a 37 $^{\circ}$ C (**A**), as formas epimastigotas (Epi) da cepa Y, mostraram uma diminuição da intensidade de fluorescência menor do que após o tratamento com 1U/ml de PIPL-C (*Bacillus thuringiensis*) durante 1 hora a 28 $^{\circ}$ C (**B**); Em formas tripomastigotas (Tripo), a redução da ligação IgG-FITC à superfície celular foi observada de maneira mais eficiente após o tratamento com a tripsina (**A**) se comparado com as células pré-tratadas com PIPL-C (**B**). Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão. (CP, controle positivo).



**Tabela I: Alteração da ligação de IgG não-específica e de BSA após tratamento enzimático.**

Forma evolutiva	Moléculas	Tratamento <sup>***</sup>	
		Tripsina*	Fosfolipase**
Epi	IgG	-62,2%	-37,8%
	BSA	-17,2%	-31,8%
Tripo	IgG	+ 75,0%	-92,3%
	BSA	-57,4%	-14,3%

Parasitas foram previamente tratados com tripsina (500µg/ml) durante 15 min. à 37° C ou PIPL-C (1U/ml) à 28° C ou à 37°C, dependendo da forma evolutiva, durante 1 hora e em seguida incubados na presença de BSA- ou IgG-FITC (5 µg/ml) à 4°C durante 30 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão

\*Tripsina (tipo X).

\*\*Fosfolipase C (*Bacillus thuringiensis*).

\*\*\*Variação em relação ao controle

#### **4.2.1. Análise comparativa da atividade endocítica de formas epimastigotas do *T. cruzi* pertencentes a diferentes cepas e clones.**

Procedemos a análise comparativa, por citometria de fluxo, da capacidade endocítica de epimastigotas das cepas Y e dos clones CL-Brener e Dm28c em relação a IgG não-específica, BSA e Lucifer Yellow (LY). Foi possível observar diferenças quantitativas no processo de endocitose entre as amostras analisadas frente às diferentes moléculas utilizadas como traçadores como será descrito adiante. As análises foram efetuadas levando-se em consideração a quantidade endocitada de cada uma das moléculas por 30.000 epimastigotas. Utilizado como traçador clássico do processo de endocitose de fase fluida, formas epimastigotas pertencentes às 3 amostras já citadas anteriormente foram incubadas na presença de LY a 28°C por diferentes intervalos de tempo. Observamos que os epimastigotas do clone CL-Brener foram os que apresentaram uma maior intensidade de fluorescência em todos os cinco intervalos de tempo que utilizamos para construir a curva de atividade endocítica, configurando assim a amostra que mais endocitou o LY (**Fig. 10A**). Os parasitos do clone Dm28c ficaram em segundo lugar na análise da atividade endocítica de LY, apresentando no entanto, com uma curva de atividade endocítica em relação ao tempo de incubação muito mais íngreme do que a apresentada pelos parasitos das duas outras amostras de *T. cruzi*. No tempo de 15 minutos os parasitos do clone Dm28c apresentaram a menor intensidade de fluorescência. Houve um aumento acentuado na quantidade de traçador endocitado entre 15 e 30 minutos de incubação. A curva permanece ascendente até o último tempo de incubação (**Fig. 10A**). Os parasitos da cepa Y apresentaram o menor valor de endocitose para o LY. Houve um discreto aumento na intensidade de fluorescência entre 15 e 60 minutos de incubação.

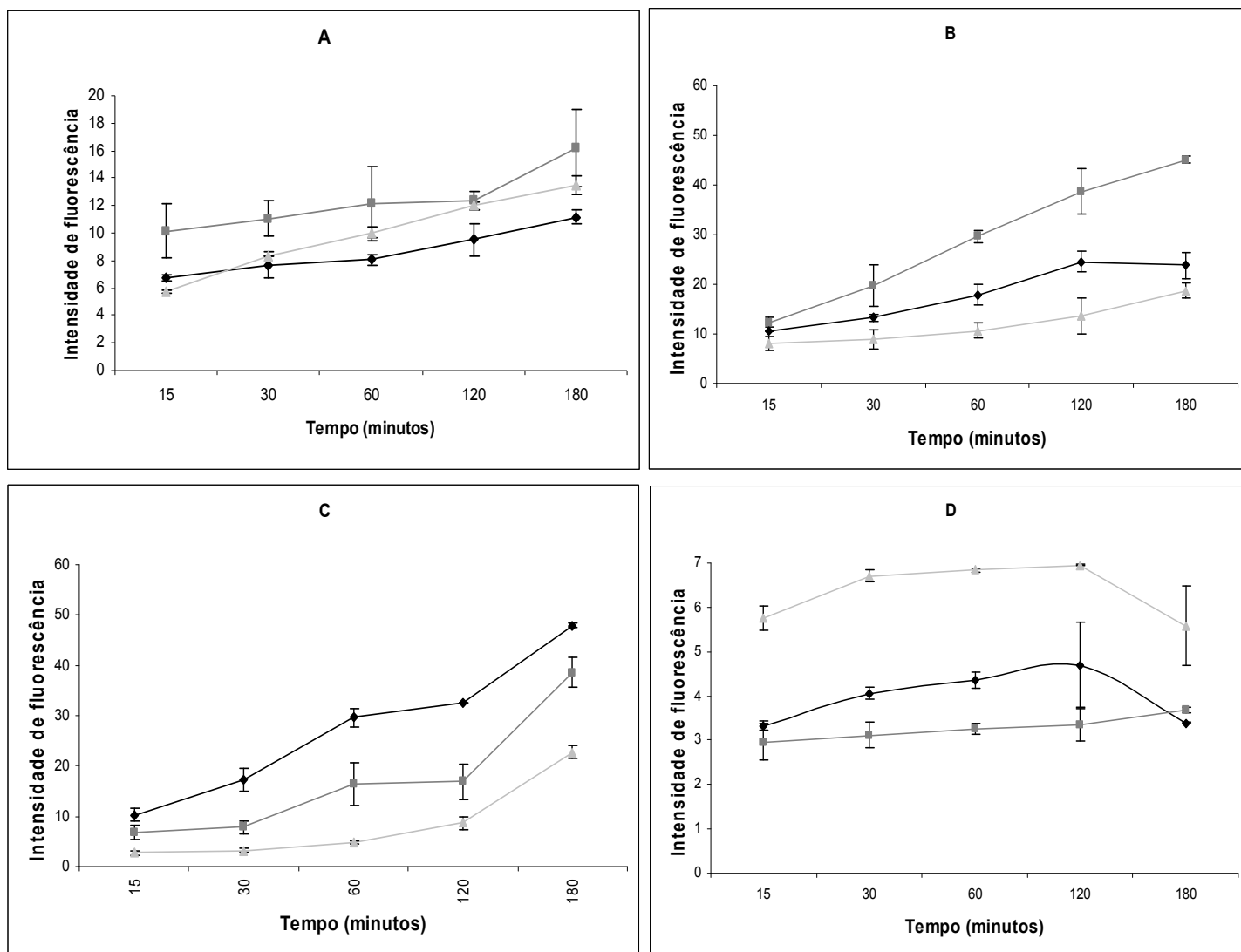
Somente após 60 minutos é que a inclinação da curva se torna mais acentuada (**Fig. 10A**). Analisando as três amostras de *T. cruzi* vimos que nas três horas de duração do processo endocítico de LY os epimastigotas dos clones CL-Brener e Dm28c e da cepa Y apresentaram um aumento na intensidade de fluorescência em relação ao tempo de 15 minutos de 57, 145 e 57%, respectivamente.

Quando a incubação das diferentes formas epimastigotas se deu na presença de BSA-Alexa 488, a mesma relação direta de aumento da intensidade de fluorescência e aumento do tempo de incubação pôde ser observada para todas as amostras analisadas (**Fig. 10B**). Os maiores níveis de fluorescência observados neste caso foram os do clone CL-Brener (**Fig. 10B**). Os níveis de fluorescência observados na cepa Y foram discretamente maiores do que os apresentados pelo clone Dm28c. A quantidade de BSA-Alexa 488 endocitada aumenta linearmente com o tempo nas três amostras analisadas, embora a inclinação das curvas de cada amostra seja um pouco diferente, demonstrando que não só a quantidade mas também a velocidade com que esta molécula é endocitada varia de acordo com a amostra (**Fig. 10B**). Após 180 minutos de incubação a quantidade de BSA-Alexa 488 acumulada pelos parasitos pertencentes a cepa Y e ao clone Dm28c representam 51 e 40% da quantidade endocitada por epimastigotas do clone CL-Brener, respectivamente (**Fig. 10B**).

A análise do processo endocítico em epimastigotas de *T. cruzi* incubadas em presença de IgG-Alexa 488, revelou um aumento na atividade endocítica diretamente proporcional ao aumento de tempo de incubação (**Fig. 10C**). Quando comparadas entre si as formas epimastigotas da cepa Y apresentaram o maior índice de endocitose de IgG-Alexa 488. Epimastigotas pertencentes aos clones CL-Brener e Dm28c, apesar de terem

apresentado menores níveis na intensidade de fluorescência, apresentaram o mesmo perfil de curva descrito para a cepa Y (**Fig. 10C**). Após 120 minutos, observamos um aumento acentuado na taxa de endocitose pelos epimastigotas das três amostras, superior àquela apresentada nos intervalos anteriores (**Fig. 10C**). Observamos também que os desvios padrão dos diferentes tempos da curva de endocitose de IgG-Alexa 488 de epimastigotas da cepa Y e do clone Dm28c são bastante reduzidos se levarmos em consideração os valores de desvio observados no clone CL-Brener para as mesmas condições experimentais (**Fig. 10C**). A quantidade total de IgG-Alexa 488 endocitada por epimastigotas dos clones CL-Brener e Dm28c após 180 minutos representa 84 e 50% da quantidade observada para parasitos da cepa Y, respectivamente.

O processo endocítico de IgG-FITC também foi analisado em formas epimastigotas da cepa Y e dos clones CL-Brener e Dm28c (**Fig. 10D**). Comparando as três amostras analisadas, o processo endocítico foi mais intenso no clone Dm28c. A curva apresentou uma inclinação maior entre os tempos de 15 e 30 minutos de incubação, enquanto entre 30 e 120 minutos o aumento da intensidade de fluorescência foi mais discreto, decaindo de maneira significativa após 180 minutos de incubação (**Fig. 10D**). Epimastigotas da cepa Y apresentaram uma curva com perfil semelhante à do clone Dm28c, apesar da intensidade de fluorescência ter sido menor (**Fig. 10D**). Já o clone CL-Brener, apresentou a menor intensidade de fluorescência das três amostras, com uma curva onde se observa, apesar de discreto, o aumento na atividade endocítica diretamente proporcional ao aumento de tempo de incubação (**Fig. 10D**).

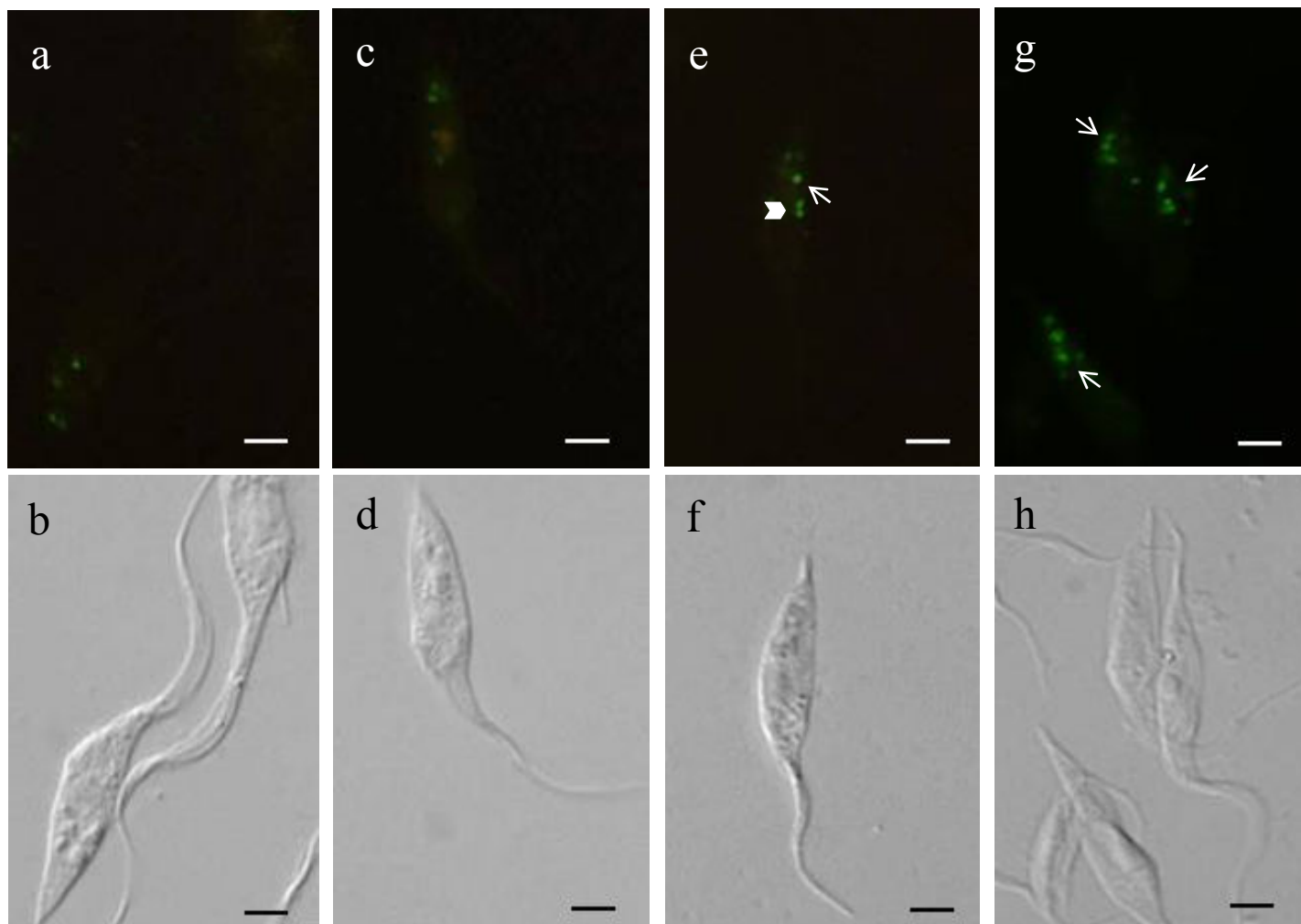


**Figura 10: Análise quantitativa do processo endocítico em epimastigotas pertencentes a diferentes cepas e clones.** Foram utilizados em diferentes experimentos traçadores para endocitose de fase fluida, Lucifer Yellow (LY) (A) e BSA-Aleva-488 (B), e mediada por receptor, IgG-Alexa-488 (C) e IgG-FITC (D). Epimastigotas da cepa Y (◆) e dos clones CL-Brener (■) e Dm28 (▲) foram incubados em meio de cultura em presença dos diferentes traçadores (5 µg/ml) e analisados nos intervalos de tempo indicados. A velocidade de interiorização assim como o total de marcador acumulado variou de acordo com o traçador e a amostra de epimastigotas utilizados. Cada ponto representa a média de três a cinco experimentos com desvio padrão.

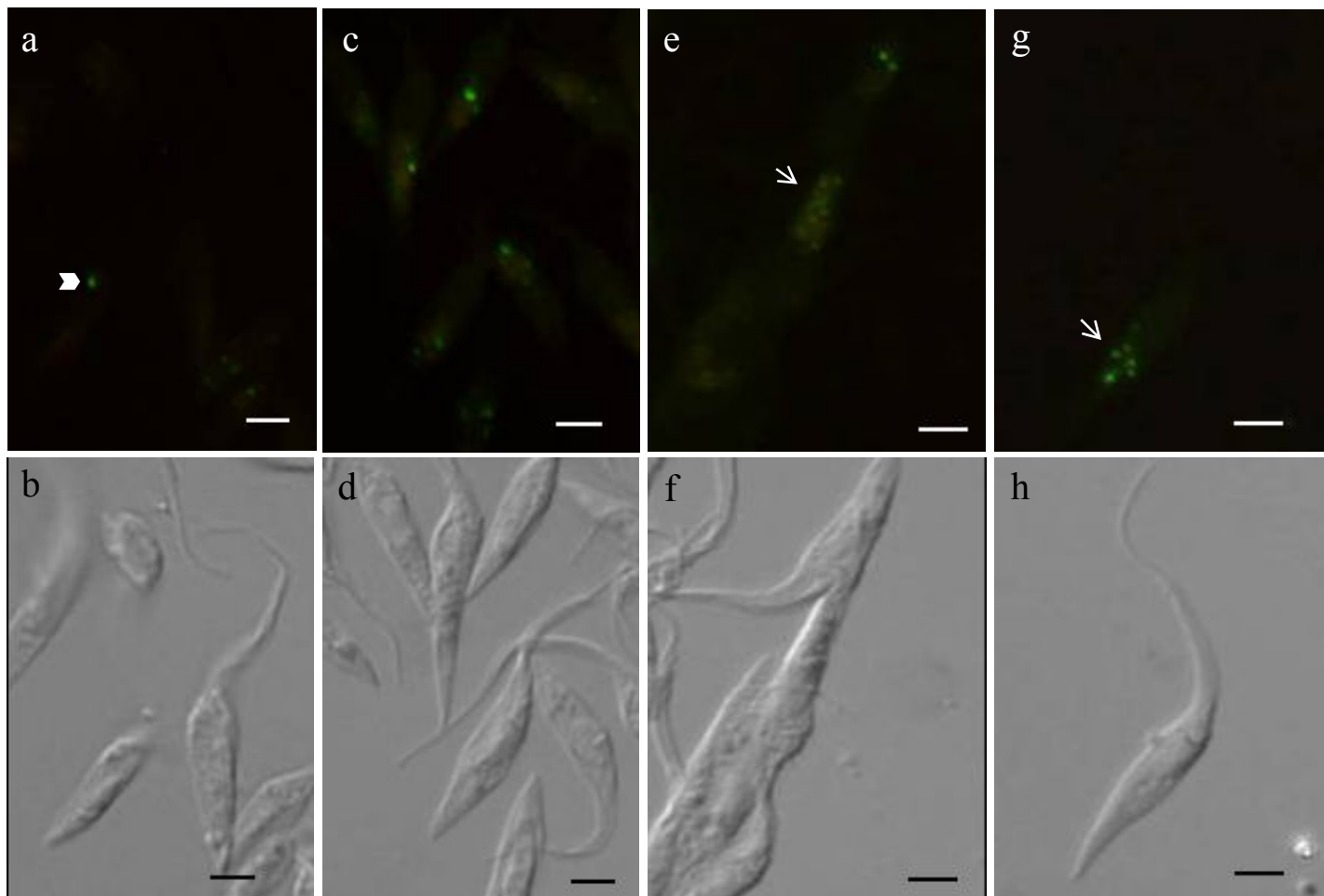
#### **4.2.2. Análise por microscopia de fluorescência do processo endocítico em epimastigotas pertencentes à cepa Y e aos clones CL-Brener e Dm28c.**

Acompanhamos por microscopia de fluorescência a interiorização de BSA- Alexa 488 por formas epimastigotas da cepa Y e dos clones CL-Brener e Dm 28c visando identificar sua localização, a percentagem de células marcadas na população total de epimastigotas além de observar o número de compartimentos da via endocítica marcados após diferentes tempos de incubação. Formas epimastigotas das diferentes amostras foram incubadas na presença de 20 µg/ml de BSA-Alexa 488 e analisadas segundo os parâmetros acima nos tempos de 15, 30, 60 e 180 minutos (**Tabela II**). Após 15 minutos, epimastigotas das três amostras apresentaram em média, dois compartimentos marcados, localizados na região antero/lateral da célula, correspondendo à citofaringe e ao compartimento endocítico inicial (**Figs. 11a e 12a**). A medida que o tempo de incubação foi aumentado, mais células se mostraram marcadas (**Figs. 11c e 12c**). Após 60 minutos, compartimentos da via endocítica fluorescentes estavam localizados na porção mediana e posterior da célula, provavelmente reservossomas (**Figs. 11e e 12e**), quanto maior o tempo de incubação, mais reservossomas foram marcados, principalmente na região posterior do parasito (**Figs. 11g e 12g**).

A determinação da percentagem de células apresentando compartimentos fluorescentes após 15 minutos de incubação com BSA-Alexa488 foi de  $29,9 \pm 3,02$ ,  $15,6 \pm 3,8$  e  $12,3 \pm 4,03$ , para os parasitos da cepa Y e clones Dm28c e CL-Brener, respectivamente (**TabelaII**). A percentagem de células marcadas aumentou com o tempo de incubação nas três amostras analisadas mostrando, no entanto, níveis diferentes.



**Figura 11: Análise cinética do processo endocítico de BSA em formas epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi* por microscopia óptica.** Parasitos foram incubados na presença de BSA-Alexa 488 (20 $\mu$ g/ml) durante 15, 30, 60 ou 180 minutos (**a**, **c**, **e**, e **g** respectivamente) a 28°C. Após 15 minutos de incubação, algumas células apresentaram fluorescência em compartimentos localizados na região antero/lateral da célula (**a**); após 60 minutos de incubação (**e**), compartimentos da via endocítica fluorescentes estavam localizados na porção mediana (**cabeça de seta**) e posterior (**seta**) do parasito; quanto maior o tempo de incubação, mais compartimentos foram marcados, principalmente na parte posterior da célula (**g**, **setas**). As figuras **b**, **d**, **f** e **h** representam imagens de contraste de fase das células observadas nas figuras **a**, **c**, **e** e **g** respectivamente. Barras de aumento correspondem à 1 $\mu$ m.



**Figura 12: Análise cinética do processo endocítico de BSA em formas epimastigotas do clone Dm28c do *T. cruzi* por microscopia óptica.** Parasitos foram incubados na presença de BSA-Alexa 488 (20 $\mu$ g/ml) durante 15, 30, 60 ou 180 minutos (**a**, **c**, **e**, e **g** respectivamente) a 28°C. Após 15 minutos de incubação, compartimentos iniciais da via endocítica aparecem marcados principalmente na região anterior do parasito (**a**, **cabeça de seta**); a medida que o período de incubação aumenta, mais compartimentos endocíticos, aparentemente reservossomos, podem ser observados marcados na região posterior da célula (**e**, **g** **setas**). As figuras **b**, **d**, **f** e **h** representam imagens de contraste de fase das células observadas nas figuras **a**, **c**, **e** e **g** respectivamente. Barras de aumento correspondem à 1 $\mu$ m.



Tabela II: Endocitose de BSA conjugada à Alexa Fluor-488 por formas epimastigotas do *T. cruzi*.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Cepa Y</b>				<b>Clone Dm28</b>				<b>Clone CL Brener</b>			
	% células marcadas	Varição em relação ao tempo anterior	Compartimentos marcados/célula	Varição em relação ao tempo anterior	% células marcadas	Varição em relação ao tempo anterior	Compartimentos marcados/célula	Varição em relação ao tempo anterior	% células marcadas	Varição em relação ao tempo anterior	Compartimentos marcados/célula	Varição em relação ao tempo anterior
15	29,9 ± 3,0		2,1 ± 0,2		15,6 ± 3,8		2,5 ± 0,4		12,3 ± 4,0		2,3 ± 0,2	
30	33,2 ± 5	+11,2%	3,3 ± 0,2	+54,4%	18,0 ± 4	+15,3%	2,7 ± 0,3	+8,0%	15,6 ± 3,8	+27,3%	2,4 ± 0,2	+2,3%
60	37,2 ± 3,2	+11,8%	5,2 ± 0,06	+57,2%	20,0 ± 2,1	+11,1%	3,7 ± 0,1	+37,0%	25,1 ± 2,3	+60,0%	3,3 ± 0,2	+33,8%
180	38,0 ± 2,8	+2,1%	5,41 ± 0,3	+3,6%	25,0 ± 3,7	+25,0%	5,8 ± 0,5	+56,0%	43,7 ± 2,5	+74%	5,2 ± 0,4	+59,4%

Formas epimastigotas pertencentes à cepa Y, clones CL-Brener e Dm28c foram incubados na presença de 20µg/ml de BSA-Alexa488 conforme descrito previamente. A porcentagem de células e o número de compartimentos intracelulares marcados foram analisados em cada amostra com incubações de 15 a 180 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão.

O número de compartimentos da via endocítica que se apresentaram fluorescentes variou em todas as amostras dependendo do período de incubação.

Após 30 minutos de incubação observamos que a porcentagem de células marcadas na cepa Y foi de 33,2% (aumento de 11,2% em relação ao observado com 15 minutos de incubação) e para os epimastigotas do clone Dm28c e CL-Brener a porcentagem de células marcadas foi de 18 e 15,6% respectivamente, o que representou um aumento de 15,3 e de 27,3% respectivamente em reação ao observado com o tempo de 15 minutos. Em relação ao número de compartimentos marcados, observamos que para a cepa Y houve um aumento de 54,7% (3,32 compartimentos por célula) em relação ao observado no tempo de 15 minutos, enquanto que para os epimastigotas do clone Dm28c e CL-Brener, o aumento observado foi de 8 e 2,9%, respectivamente (**Tabela II**).

Após 60 minutos de incubação houve um aumento de 11,8, 11,1 e 60% de epimastigotas marcados da cepa Y, e clone Dm28c e CL-Brener, respectivamente, em relação ao observado no tempo de 30 minutos. Houve também um aumento significativo (57,2%) no número de compartimentos marcados na cepa Y enquanto que nos epimastigotas dos clones Dm28c e CL-Brener, o número de compartimentos marcados aumentou respectivamente 37 e 33%.

Após um tempo de incubação mais longo de 180 minutos a porcentagem de células marcadas na cepa Y foi de  $38 \pm 2,8\%$ , e nos parasitos pertencentes ao clone Dm28c e CL-Brener foi de  $25 \pm 3,7\%$  e  $43,7 \pm 2,5\%$  respectivamente. O aumento apresentado pelo clone CL-Brener em relação ao tempo anterior, 60 minutos, foi de 70%. O aumento acumulado na porcentagem de parasitos marcados do clone CL-Brener entre 15 e 180 minutos de incubação foi de 255%.

De uma maneira global, vimos que a cepa Y é aquela que mais rapidamente alcança os valores máximos de percentagem de células e número de compartimentos marcados. No caso dos parasitos do clone Dm28c os aumentos são progressivos. Quando analisamos os parasitos do clone CL-Brener observamos diferenças mais significativas na porcentagem de parasitos marcados após cada tempo de incubação enquanto que o número de compartimentos marcados apresentou uma cinética bastante semelhante a apresentada pelo clone Dm28c. Ao final de 180 minutos de incubação, no entanto, o número de compartimentos marcados nas três amostras é semelhante (**Tabela II**).

Foi possível observar também tamanhos distintos de compartimentos endocíticos nos diferentes tempos de incubação (**Tabela III**). Apesar da observação de variação no diâmetro dos compartimentos nos primeiros 60 min nas três populações de epimastigotas analisadas, valores similares foram observados após 180 min de incubação. Apesar das diferenças observadas, análises estatísticas revelaram que o tamanho dos compartimentos endocíticos não foram significativamente distintos ( $p > 0,05$ ) em nenhuma das populações analisadas entre si e entre os diferentes tempos de incubação.

**Tabela III: Diâmetro de compartimentos da via endocítica em formas epimastigotas do *T. cruzi*.**

Amostra	Tempo (minutos)			
	15	30	60	180
<b>Cepa Y</b>	1,35 ± 0,01*	1,54 ± 0,2	1,90 ± 0,02	1,92 ± 0,04
<b>Clone Dm28c</b>	1,61 ± 0,02	1,55 ± 0,02	1,75 ± 0,03	1,93 ± 0,03
<b>Clone CL-Brener</b>	1,48 ± 0,03	1,52 ± 0,02	1,80 ± 0,1	1,92 ± 0,03

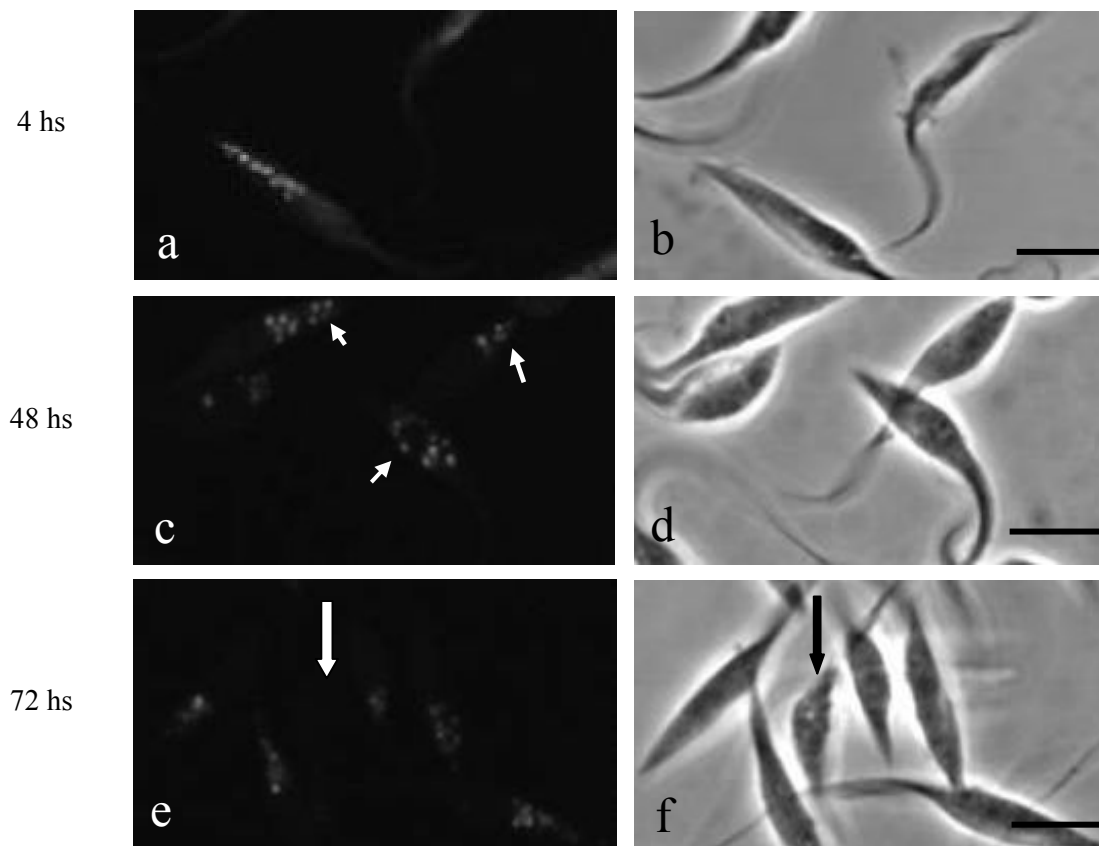
Parasitos foram incubados na presença de BSA-Alexa 488 (20µg/ml) à 28° C durante diferentes intervalos de tempo. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão.

\*Diâmetro dos compartimentos estão expressos em µm.

Análises estatísticas revelaram resultados não significativos ( $p > 0,05$ ) entre diferentes tempos de incubação e populações analisadas.

### **4.2.3. Comportamento dos compartimentos da via endocítica em cinética de longa duração.**

Analisamos por microscopia de fluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão, o comportamento de compartimentos marcados da via endocítica de epimastigotas do *T. cruzi* em intervalos de tempo mais longos, ao que denominamos de cinética de longa duração. Após um período de pulso de 4 horas na presença de IgG-TRITC ou do complexo IgG-ouro coloidal, os parasitos foram lavados para remoção do traçador não endocitado e incubados por períodos de tempo de 24, 48 e 72 horas (períodos de caça). Após um pulso de 4 horas, observamos vários compartimentos marcados concentrados na região posterior do corpo dos parasitos (**Fig. 13a**). Com um período de caça de 48 horas, é possível observar um maior número de parasitos apresentando compartimentos marcados na região posterior da célula, embora em alguns deles estes compartimentos se encontrem também a volta do núcleo (**Fig. 13c**). Após 72 horas, no entanto, encontramos uma redução de aproximadamente 30% na porcentagem de células marcadas e um número menor de compartimentos fluorescentes nestas células que estão na maioria das vezes, localizados na região posterior do corpo do parasito (**Fig. 13e**). Resultados obtidos nestas mesmas condições experimentais, sugerem que com a divisão, parasitos marcados dêem origem a parasitos não marcados, ou que durante a divisão celular epimastigotas dividam os compartimentos marcados com as células filhas gerando parasitos com um número menor de compartimentos fluorescentes (**Fig. 13e**).



**Figura 13: Análise por microscopia de fluorescência do comportamento dos compartimentos da via endocítica em cinética de longa duração.** Formas epimastigotas pertencentes à cepa Y incubadas a 28°C durante 4 horas em presença de IgG-TRITC (20µg/ml) mostram vários compartimentos marcados concentrados na região posterior da célula (**a**); após um período de caça de 48 horas, é possível observar compartimentos marcados também na região perinuclear (**c**, **setas menores**) bem como na região posterior (**c**, **seta maior**); após 72 horas, pode-se observar um menor número tanto de células como de compartimentos marcados, assim como parasitos não marcados (**e**, **seta**). As figuras **b**, **d** e **f** representam imagens de contraste de fase das células observadas nas figuras **a**, **c** e **e** respectivamente. Barras de aumento correspondem à 1µm.

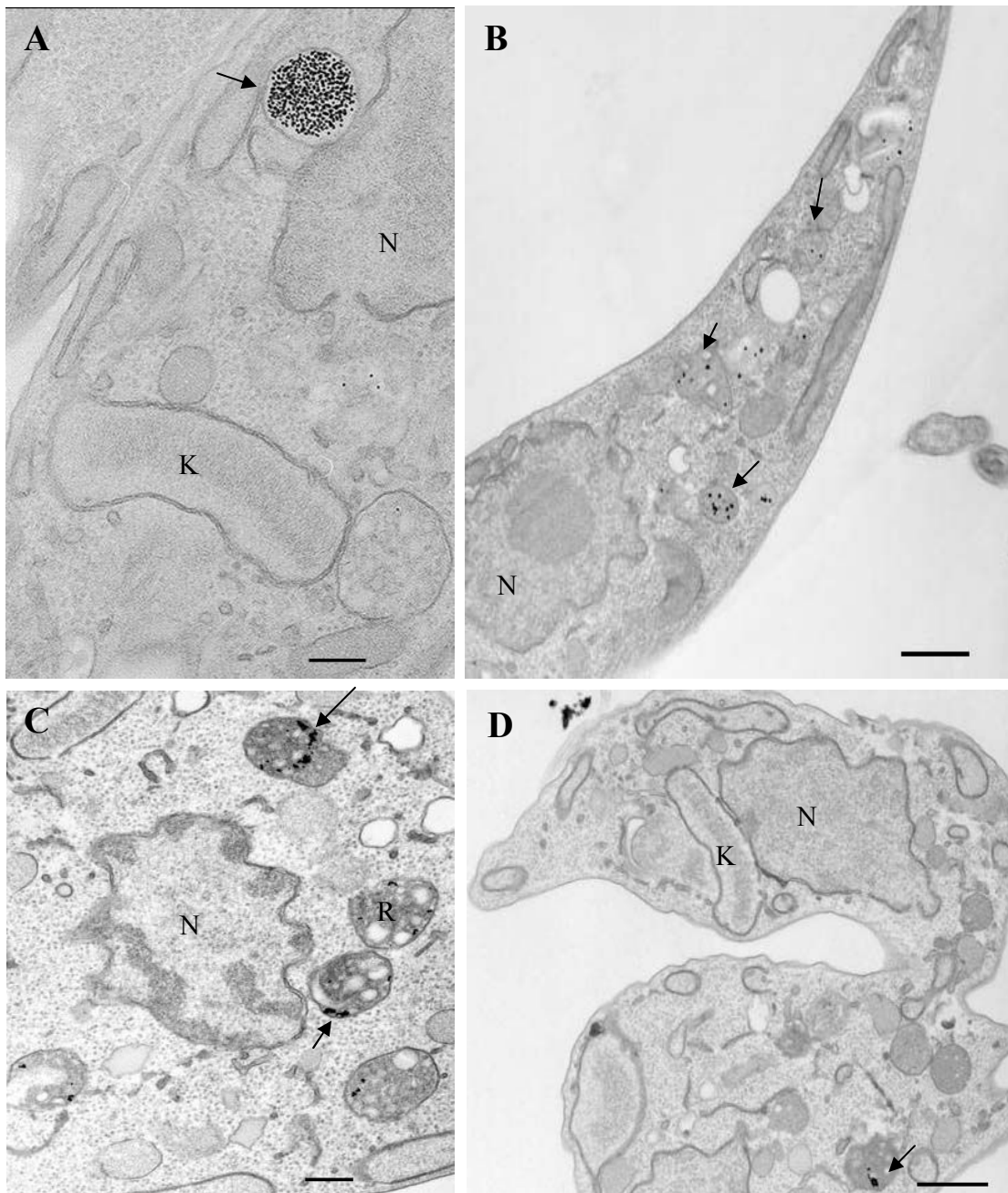
Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão mostram que eventualmente, algumas citofaringes se alongam em direção à região posterior da célula (**Fig.14A**). A marcação da citofaringe após o pulso de 4 horas vista ao microscópio eletrônico de transmissão é facilmente notada devido ao perfil circular da organela, a presença de “coat” voltado para a sua luz e a grande quantidade de partículas de ouro concentradas nesta região que contrasta com a densidade de partículas encontradas no interior dos reservossomas, (**Fig. 14A**). Nestas análise fica também confirmada a presença de vários compartimentos marcados na região posterior da célula (**Fig. 14B**). Após um período de caça de 48 horas, os compartimentos marcados podem ser observados na região perinuclear (**Figs. 14C**). Na figura 14D podemos observar uma célula em seu proceso final de divisão onde apenas uma das células apresenta marcação com partículas de ouro coloidal, confirmando as observações previamente descritas em imagens de microscopia de fluorescência.

#### **4.2.4) Efeito da inibição de fosfatidilinositidio 3-quinase (PI<sub>3</sub>-quinase) na endocitose de IgG e BSA**

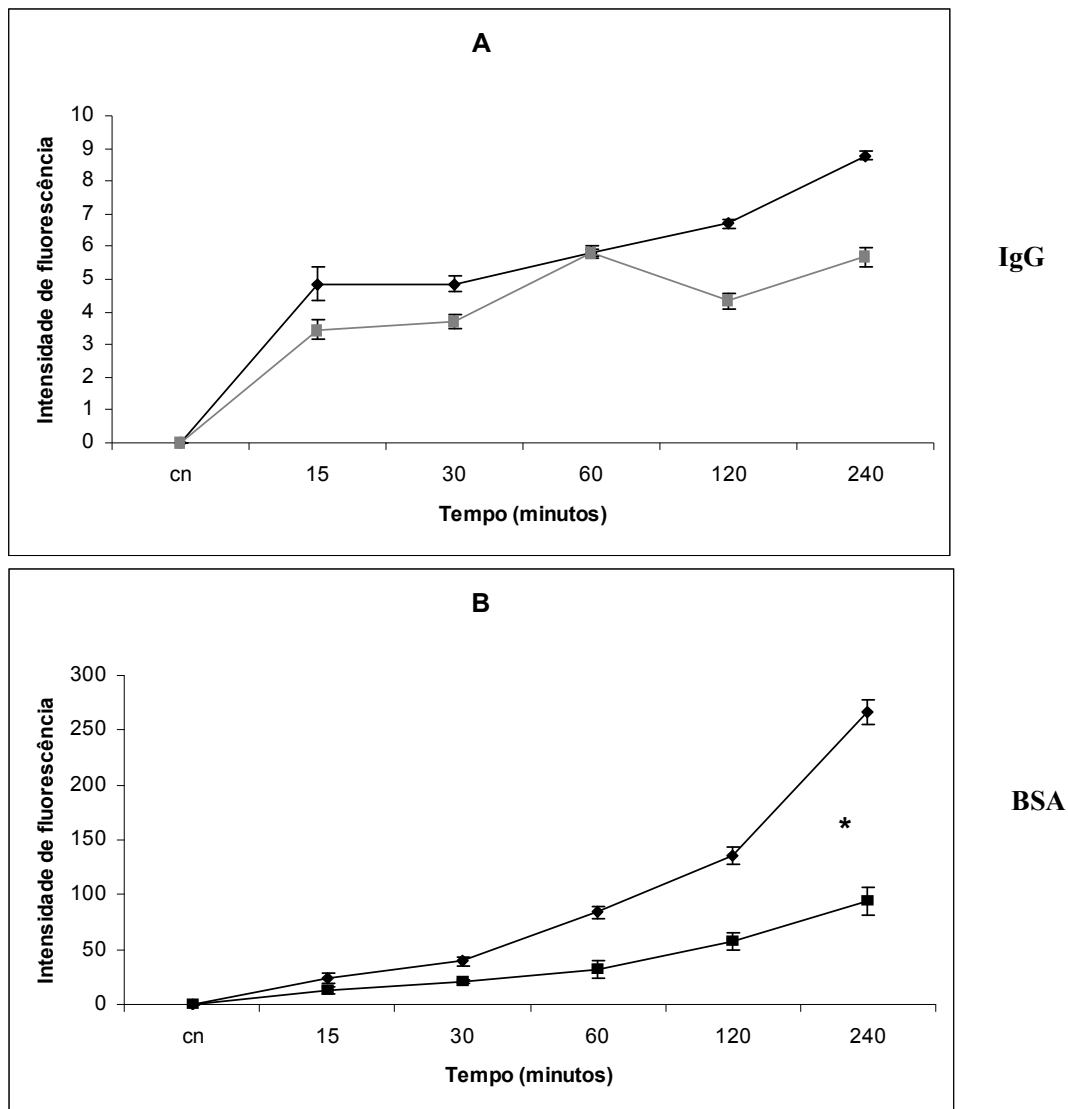
O papel dos diferentes compartimentos intracelulares no controle do tráfego de vesículas no *T. cruzi*, vem sendo estudado. Diversos compostos são utilizados na tentativa de inibir diferentes passos do processo endocítico, afim de se conhecer melhor toda a via endocítica. Vários estudos indicam que a endocitose mediada por receptores ocorre independentemente da ativação da PI<sub>3</sub>-quinase. Em contraste, a utilização de inibidores de PI<sub>3</sub>-quinase mostraram capazes de inibir a endocitose de fase fluida. Possivelmente a ação da PI<sub>3</sub>-quinase é mais importante no tráfego intracelular de

membrana que se segue logo após a interiorização de moléculas, e esta inibição do tráfego pós-endocítico afeta em maior nível a endocitose de fase fluida (ARAKI, JONHSON & SWANSON, 1996). No sentido de se observar se a PI<sub>3</sub>-quinase é acionada durante o processo endocítico do *T. cruzi*, utilizamos o composto LY294002, um análogo de quercetina, que inibe de maneira específica a enzima PI<sub>3</sub>-quinase. Após um pré-tratamento de 1 hora a 28°C em presença de LY294002, epimastigotas da cepa Y foram incubados na presença de IgG ou BSA conjugadas à FITC. A análise obtida através de citometria de fluxo foi comparada com o resultado de amostras controle que foram apenas incubadas em presença dos traçadores fluorescentes sem nenhum pré-tratamento. A análise do processo endocítico por epimastigotas de *T. cruzi* incubadas em presença de IgG-FITC, revelou um aumento na atividade endocítica diretamente proporcional ao aumento de tempo de incubação (**Fig. 15A**). Quando comparados os resultados, a curva da atividade endocítica dos parasitos pré-tratados com o composto aparece ligeiramente deslocada para baixo, no entanto de maneira não significativa. Já epimastigotas incubados com BSA-FITC apresentaram um deslocamento bem mais acentuado na curva de fluorescência, indicando uma significativa ( $p < 0,05$ ) redução na atividade endocítica e sugerindo portanto, o envolvimento da atividade de PI<sub>3</sub>-quinase na endocitose de BSA (**Fig. 15B**).





**Figura 14: Análise por microscopia eletrônica de transmissão do comportamento dos compartimentos da via endocítica em cinética de longa duração.** Alguns epimastigotas da cepa Y incubados a 28°C durante 4 horas em presença de IgG-Au (20µg/ml) apresentam partículas de ouro concentradas no interior da citofaringe, que em alguns parasitos se prolonga até a região nuclear (**A, seta**); após este período, um grande número de parasitos já apresenta marcação em reservossomas, na região posterior da célula (**B, setas**). Após um período de caça de 48 horas, os compartimentos marcados podem ser observados em reservossomas na região perinuclear (**C, setas**). Imagens obtidas após 72 horas de caça, sugerem que com a divisão, parasitos marcados (**D, seta**) dêem origem a parasitos não marcados. Barras de aumento correspondem à 0,1µm. N, núcleo; K, cinetoplasto; R, reservossomos.



**Figura 15: Efeito da inibição de PI<sub>3</sub>K na endocitose de IgG e BSA.** Epimastigotas da cepa Y incubados na presença de IgG (A ♦) ou BSA-FITC (B ♦) durante períodos entre 15 e 240 minutos. A intensidade de fluorescência obtida em cada ponto analisado gerou uma curva com o perfil cinético da endocitose destas moléculas. Após um pré-tratamento de 1 hora a 28°C em presença de LY294002 (A ■, B ■) uma redução na atividade endocítica frente a inibição da PI<sub>3</sub>K é observada de maneira significativa apenas no caso BSA-FITC (B ■, \* p< 0,05). Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com o desvio padrão.

### 4.3. Análise do processo de “shedding” em *T. cruzi*.

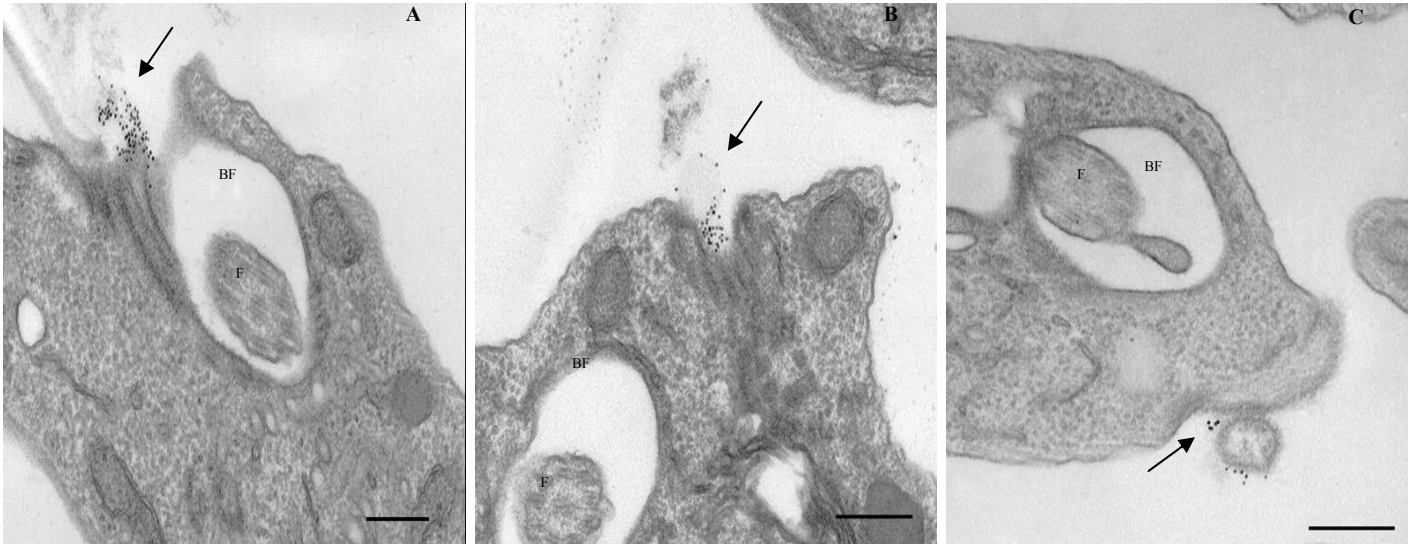
Estudos prévios demonstraram que a ligação da lectina Con A à superfície do *T. cruzi*, mais particularmente a forma tripomastigota, era capaz de promover a mobilidade de componentes de superfície da célula gerando “capping” destas moléculas (SZARFMAN, QUEIROZ, DE SOUZA, 1980). A incubação de imunoglobulinas específicas contra o parasito também é capaz de provocar reação semelhante na superfície dos parasitos levando à um descarte dos anticorpos através da liberação de pequenas vesículas de 20nm de diâmetro ou de um material amorfo eletrondenso que podem ser vistos entre as células nas preparações de microscopia eletrônica de transmissão (GONÇALVES et al., 1991). Decidimos então acompanhar o processo de “shedding” nas formas epimastigotas e tripomastigotas por citometria de fluxo e por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão em parasitos incubados na presença de imunoglobulinas específicas e não-específicas e verificar a influência de PMA e fenantrolina neste processo.

#### 4.3.1. “shedding” em formas epimastigotas.

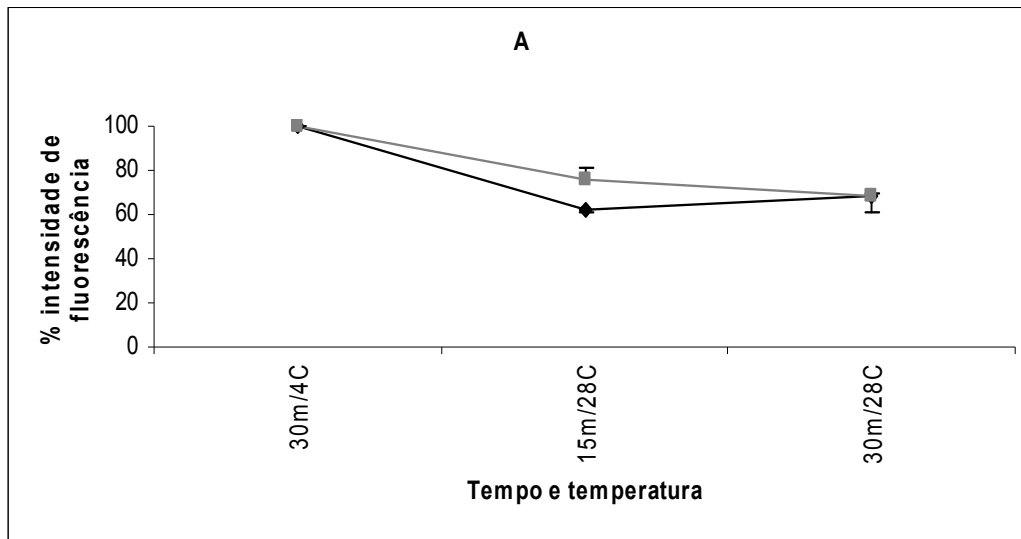
Epimastigotas da cepa Y incubados a 4 °C durante 30 minutos na presença de anticorpos não-específicos complexados à partículas de ouro coloidal e processados para microscopia eletrônica de transmissão, apresentavam uma grande quantidade de partículas de ouro no espaço extracelular aderidas sobre uma material amorfo e eletrondenso que se desprende da região do citóstoma (**Fig. 16A**). Em algumas células observamos a marcação de ouro coloidal sobre vesículas de aparência amorfa ou de vesículas apresentando unidade de membrana com “coat” característico da região do

citóstoma, que se projetavam de diferentes regiões desta organela (**Figs. 16B, C**). Como os parasitos foram incubados a 4°C e também fixados a esta temperatura, acreditamos que o processo de “shedding” de componentes de superfície aconteça normalmente a 28°C e tenda a ser paralizado ou continue a existir de maneira menos expressiva mesmo a 4°C.

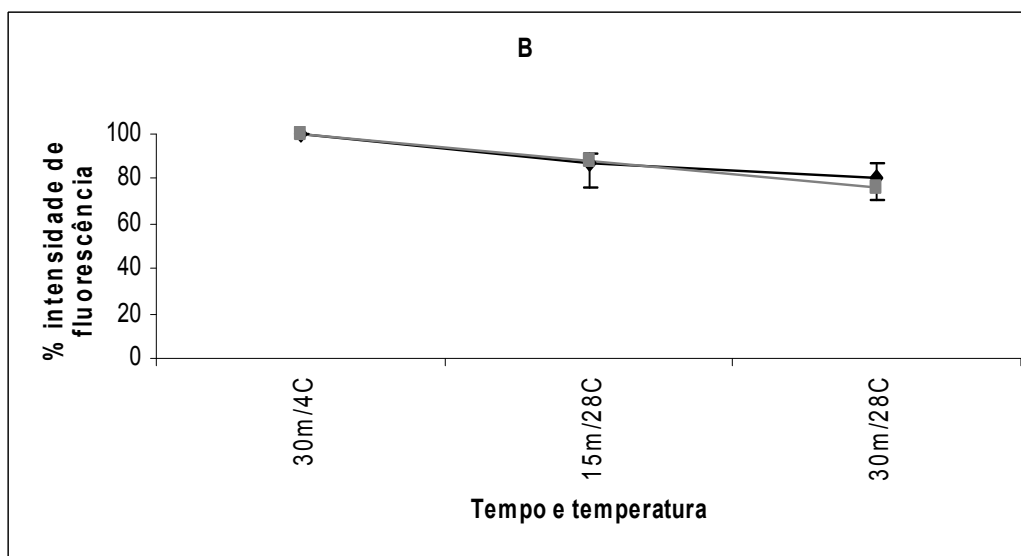
Para verificar estas duas possibilidades, analisamos por citometria de fluxo, se o processo de “shedding” ocorria na forma epimastigota da cepa Y e do clone CL-Brener quando na presença de IgG não-específica e de Con A. Epimastigotas da cepa Y foram incubados a 4°C durante 30 minutos em presença de IgG-Alexa 488 ou Con A-FITC, após este período os parasitos foram lavados para retirada das moléculas livres no meio e então incubados a 28°C por 15 e 30 minutos. Após 15 minutos de incubação, epimastigotas da cepa Y apresentaram uma diminuição da porcentagem de fluorescência relativa à ligação de IgG não-específica em torno de 28% indicando “shedding” destas moléculas (**Fig. 17A**). Após 30 minutos uma discreta recuperação da fluorescência, de aproximadamente 10%, pôde ser observada (**Fig. 17A**), no entanto esta diferença não pode ser considerada significativa uma vez que está dentro da margem de erro do experimento. Em formas epimastigotas do clone CL-Brener, a diminuição na porcentagem de intensidade de fluorescência relativa à ligação de IgG não-específica foi observada de maneira menos expressiva do que a observada com a cepa Y. A redução na intensidade de fluorescência foi de 13% e 20% após 15 e 30 minutos, respectivamente (**Fig. 17B**). A realização de experimentos sob as mesmas condições mas em presença de Con A-FITC demonstrou que esta molécula também é liberada da superfície com a mesma intensidade observada nos experimentos com IgG não-específica (**Fig. 17A-B**).



**Figura 16: Análise de formas epimastigotas incubadas em presença de IgG não-específica indicam a ocorrência de “shedding”.** Parasitos incubados a 4°C apresentam grande número de partículas de ouro coloidal no citóstoma. Em algumas células, estas partículas aparecem associadas a um material filamentoso fora da superfície celular (A), em outras esta marcação pode ser observada sendo projetada a partir do citóstoma como uma bolha (B). Partículas de ouro coloidal podem ainda ser detectadas associadas a vesículas (C). F, flagelo; BF, bolsa flagelar. As barras de aumento correspondem a 0,3 $\mu$ m.



Y



CL-Brener

**Figura 17: Análise quantitativa do processo de “shedding” em formas epimastigotas.** Parasitos da cepa Y (A) foram incubados a 4°C na presença de IgG de cabra anti-coelho-Alexa 488. Após uma segunda incubação a 28°C por 15 minutos, foi possível observar decaimento na intensidade de fluorescência, sugerindo a ocorrência de “shedding” nestas condições (◆-IgG-Alexa 488). Após 30 minutos, o processo ocorreu de maneira menos intensa. A incubação com ConA demonstrou perfis similares ao descrito anteriormente (■-Con A-FITC); epimastigotas do clone CL-Brener (B) mostraram maior decaimento da fluorescência após 30 minutos de incubação a 28°C (◆-IgG-Alexa 488), mas a ocorrência do “shedding” parece ser menor que na cepa Y. Neste caso a ConA também mostrou o mesmo padrão de comportamento (■-Con A-FITC). Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão.

#### 4.3.2. “Shedding” em formas tripomastigotas

A análise do processo de “shedding” nas formas tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener foi realizada em tripomastigotas obtidos a partir de cultura de células infectadas na presença de 4 tipos diferentes de ligantes que foram: a) imunoglobulinas totais específicas contra o *T. cruzi* de soro de paciente chagásico; b) imunoglobulinas não-específicas; c) con A e d) ferritina cationizada (molécula catiônica utilizada regularmente no estudo de carga de superfície de diferentes tipos celulares, que quando incubada com células vivas pode provocar um intenso “shedding”).

Como imagens de processo de cinética rápida e de marcação de superfície ficam difíceis de serem analisadas em microscopia eletrônica de transmissão, pois, dependem do plano de corte da amostra e de um grande número de imagens para que a análise seja estatisticamente confiável, resolvemos utilizar também a microscopia eletrônica de varredura que fornece uma visão mais ampla da superfície do parasito, facilitando a quantificação e a localização das vesículas de “shedding”.

Os resultados obtidos através desta análise mostraram que uma pequena porcentagem de parasitos pertencentes à cepa Y incubados a 37°C durante 30 min em meio de cultura, apresentam vesículas em sua superfície, principalmente na região da saída da bolsa flagelar (**Fig. 18A**), confirmando que o “shedding” é um fenômeno constitutivo nos parasitos desta cepa. Quando os mesmos parasitos foram incubados a 4°C na presença de IgGs não-específicas (**Fig. 18B**), o número de células apresentando vesículas aumentou em cerca de 20%, geralmente localizadas na região da saída da bolsa flagelar. Por outro lado, quando as células, após incubação em baixa temperatura, foram submetidas a uma segunda incubação de 30 min a 37°C o processo de “shedding” foi bem

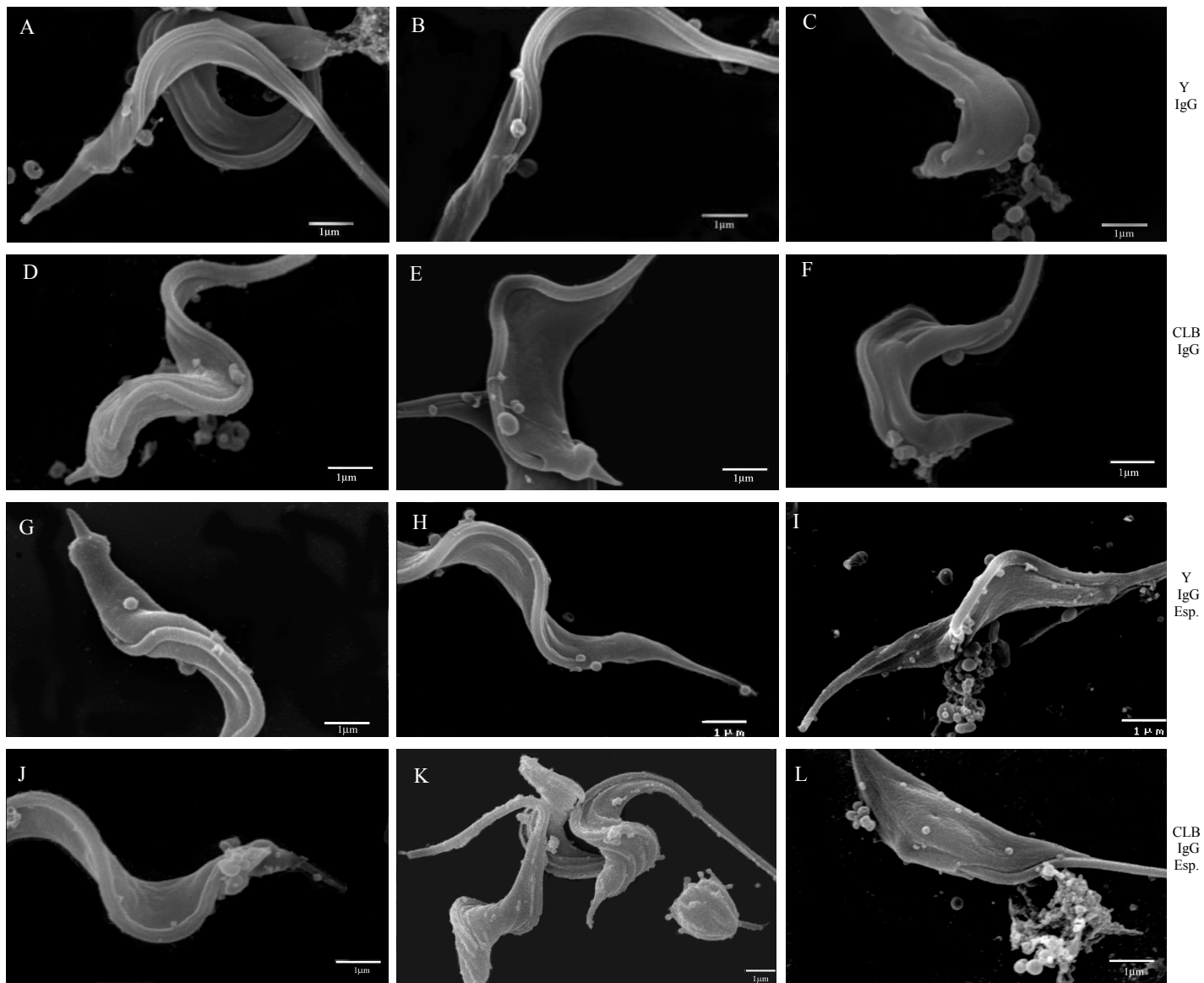
mais intenso e frequente (cerca de 30% maior do que as células incubadas a baixa temperatura) (**Fig. 18C**), e, neste caso vesículas puderam ser observadas também na superfície celular na região posterior do parasito. Resultados obtidos através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) confirmam que tripomastigotas da cepa Y apresentam uma grande quantidade de vesículas de “shedding”, quando incubadas em presença de IgG não-específica mesmo a 4°C (**Fig. 19A-D**), e mostram que estas vesículas parecem se acumular principalmente na saída da bolsa flagelar (**Fig. 19A-C**). Quando a temperatura é maior, é muito mais comum a observação de vesículas principalmente no meio extracelular (**Fig. 19E, F**). Os resultados obtidos através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostram que em formas tripomastigotas do clone CL-Brener o “shedding” também é um processo constitutivo (**Fig. 18D**). Quando incubados na presença de IgG não-específica a 4°C, algumas vesículas na região de saída da bolsa flagelar também são observadas (**Fig. 18E**). Após uma segunda incubação a 37°C, imagens de varredura mostram que o processo de “shedding” foi cerca de 25% mais frequente do que em células incubadas a baixa temperatura (**Fig. 18F**). Imagens obtidas em MET, mostram no entanto que é mais difícil a observação de tantas vesículas junto à saída da bolsa flagelar em baixa temperatura (**Fig. 20A, B**). Por sua vez, parasitos incubados à temperatura de 37°C, apresenta tanto vesículas assim como um material amorfo eletrondenso de maneira bem mais freqüente quando comparado às amostras incubadas à baixa temperatura (**Fig. 20C, D**).



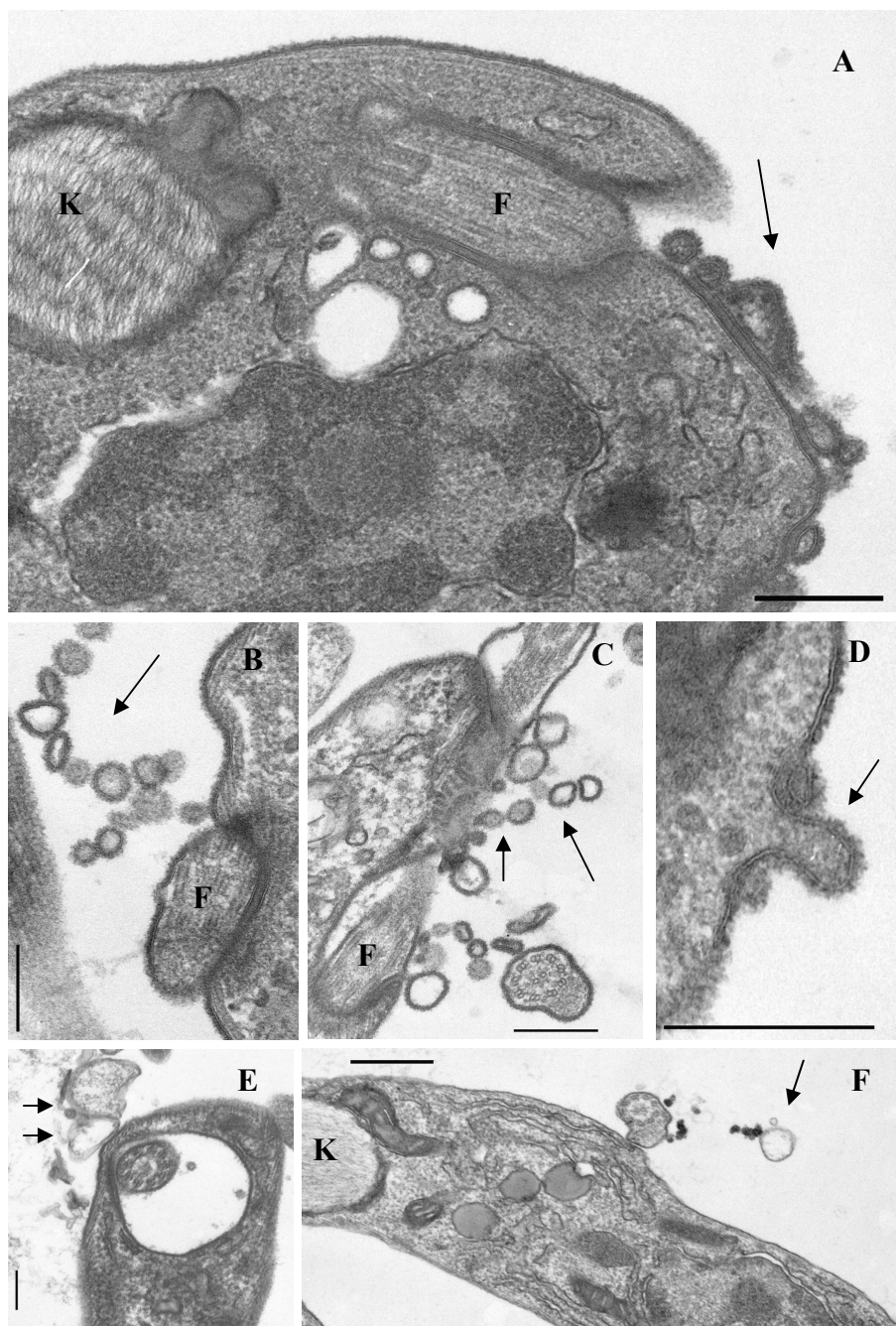
30 min/37°C meio de cultura

30 min/4°C

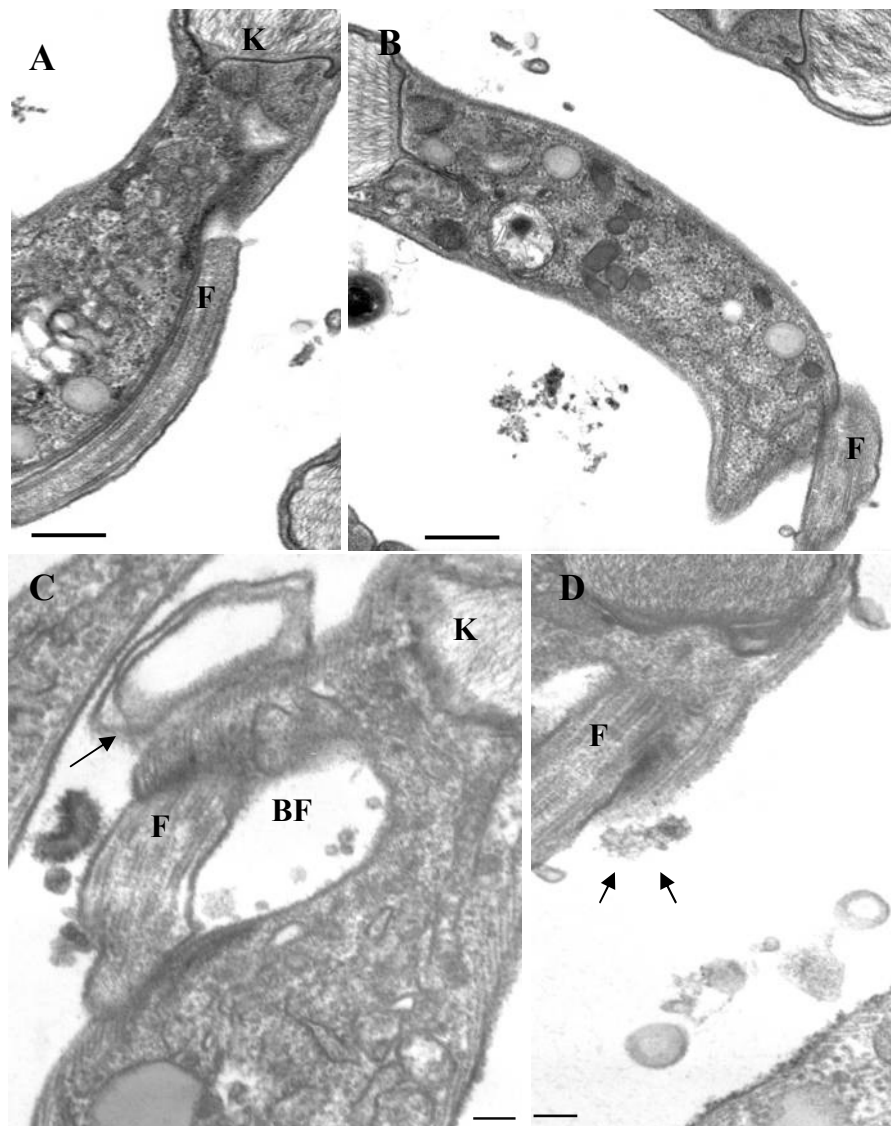
30 min/37°C



**Figura 18: Indução de “shedding” em tripomastigotas do *T. cruzi* por IgGs específicas e não-específicas.** Formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y em ensaios realizados na presença de meio de cultura sem soro fetal bovino durante 30 minutos a 37°C (A) ou na presença de IgG não-específica (cabra anti-coelho) a 4°C (B) e a 37°C por mais 30 minutos (C). Experimentos realizados sob as mesmas condições acima com o clone Cl-Brener (D-F). Formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y em ensaios realizados na presença de meio de cultura sem soro durante 30 minutos a 37°C (G) ou na presença de IgG específica (soro de paciente chagásico) a 4°C (H) e a 37°C por mais 30 minutos (I). Experimentos realizados sob as mesmas condições acima com o clone Cl-Brener (J-L). As barras de aumento correspondem a 1 µm.

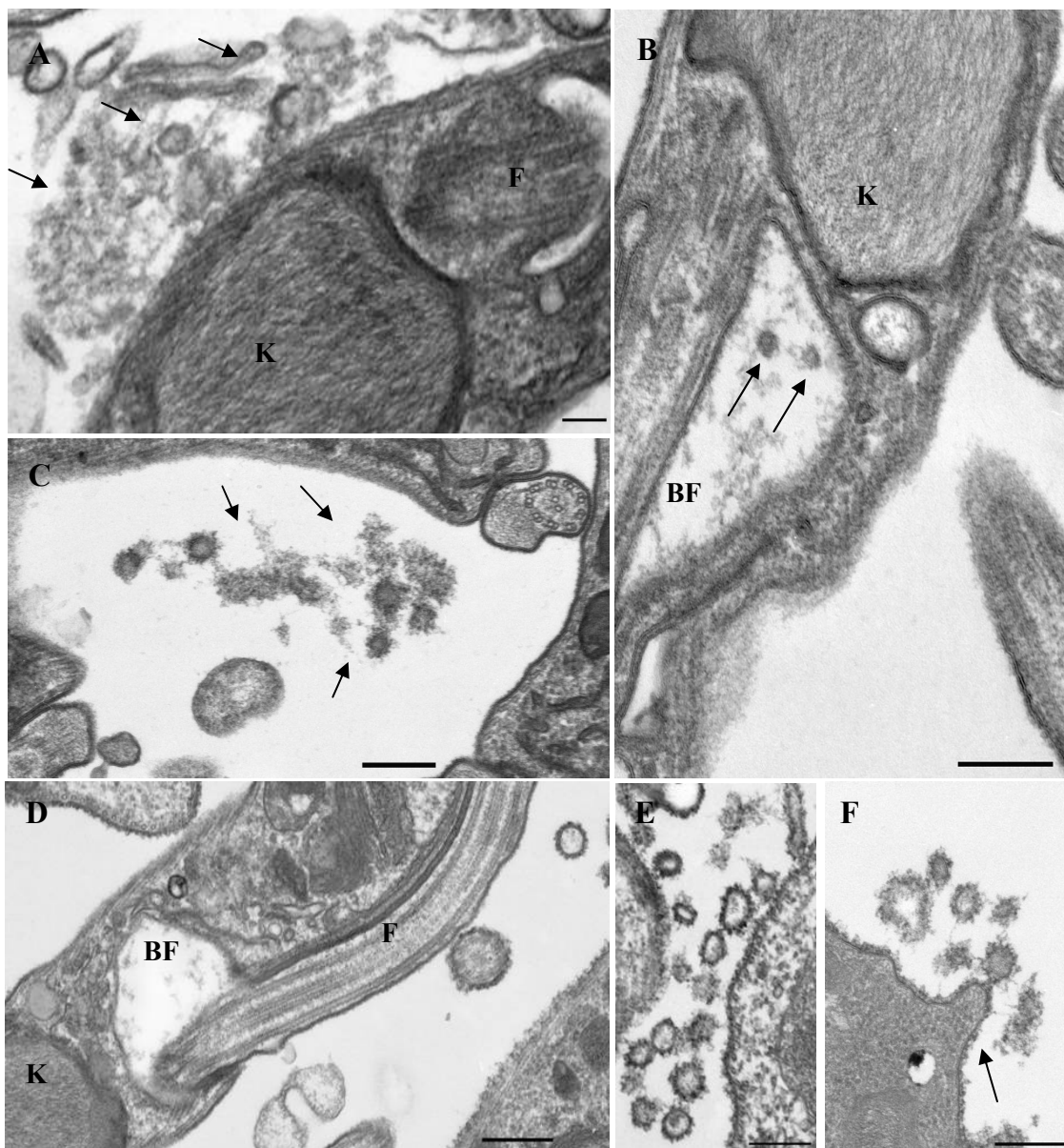


**Figura 19: Formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y incubadas na presença de IgG não-específica.** As células da cepa Y incubadas a 4°C em presença de IgG (cabra anti-coelho) já mostram bastante vesículas (A-D). Estas vesículas parecem se acumular principalmente na saída da bolsa flagelar (A-C, setas). Detalhe mostrando a formação de vesículas a partir da membrana (D, seta). Quando a temperatura de incubação foi aumentada para 37°C, as vesículas foram frequentemente observadas já liberadas do corpo dos parasitos (E, F, setas). F, flagelo; K, cinetoplasto. Barras de aumento correspondem a 0,3µm (A-D, F) e 0,2µm (E).

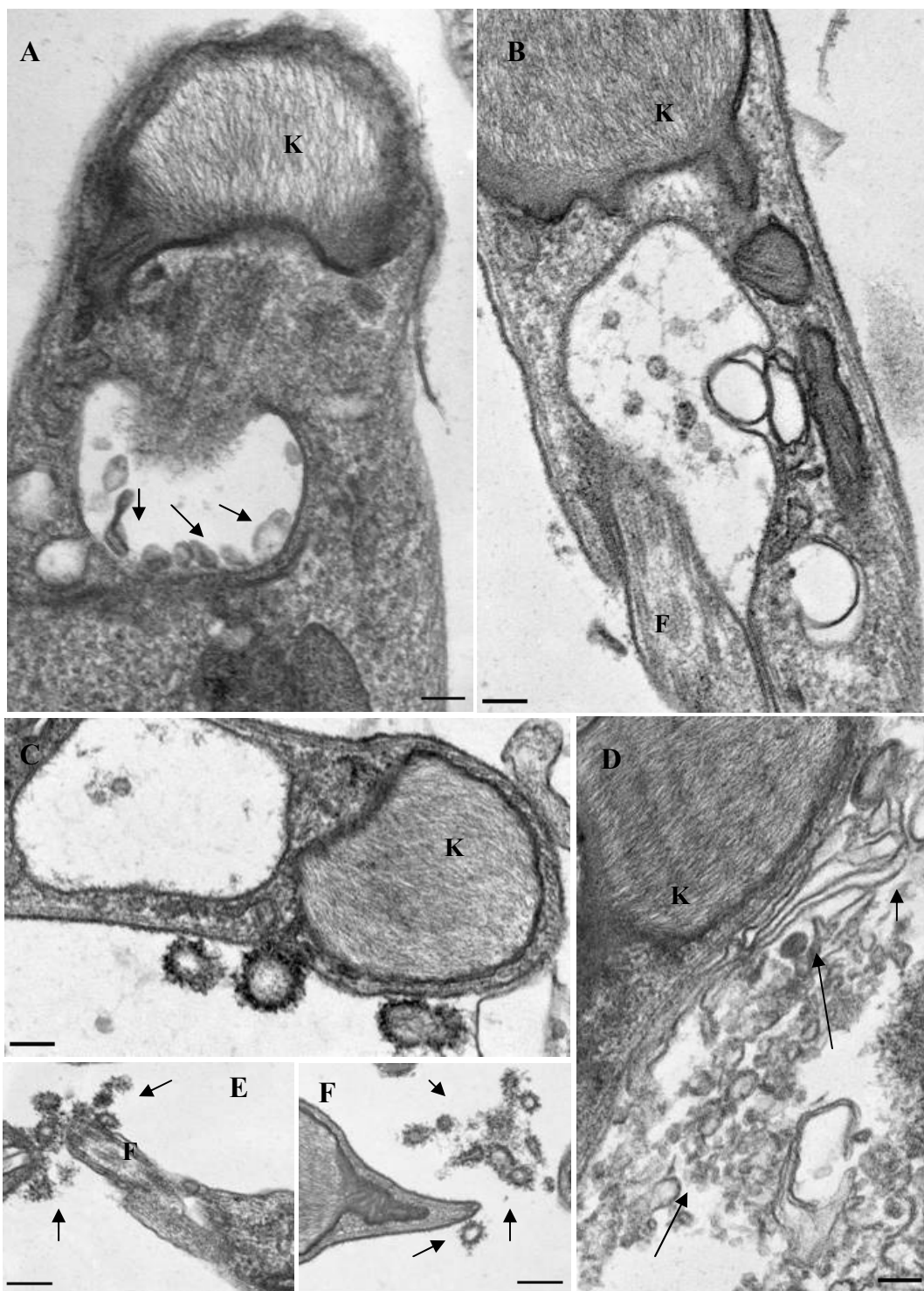


**Figura 20: Formas tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener incubadas na presença de IgG não-específica.** As células do clone CL-Brener incubadas a 4°C em presença de IgG (cabra anti-coelho) não mostram a presença de vesículas (A-B). Quando a temperatura de incubação foi aumentada para 37°C, foi possível a observação de perfis de membrana (C, seta) e de material amorfo eletrondenso na saída da bolsa flagelar (D, setas). F, flagelo; K, cinetoplasto; BF, bolsa flagelar. Barras de aumento correspondem a 0,2µm (A,B) e 0,3µm (C, D).

Quando os experimentos foram realizados em presença de soro específico contra o *T. cruzi* a 4°C (**Fig. 18H**), tripomastigotas da cepa Y apresentaram cerca de 25% mais células com vesículas quando comparadas ao controle (**Fig. 18G**). Um processo mais intenso e frequente ocorreu durante a incubação a 37°C (**Fig. 18I**), onde cerca de 35% das células apresentaram vesículas sendo projetadas da superfície em imagens de varredura. Imagens de MET confirmam a presença destas vesículas mesmo à baixa temperatura, localizadas principalmente na região de saída da bolsa flagelar e no meio extracelular (**Fig. 21A-C**), no entanto de uma maneira mais dispersa do que observamos em presença de IgGs não-específicas. A 37°C, as imagens mostram a presença de vesículas de maneira mais intensa (**Fig. 21D- F**). Após incubação na presença de IgG-específica à baixa temperatura, análises através de MEV, mostram que formas tripomastigotas do clone CL-Brener já apresentam algumas vesículas de “shedding” inclusive com a observação de algumas formas amastigotas também com perfis de “shedding” de vesículas (**Fig. 18K**). A 37°C, de maneira semelhante ao observado na cepa Y, ocorreu um processo mais intenso e frequente, inclusive em formas intermediárias (**Fig. 18L**). Imagens de MET, revelam que estes parasitos, quando incubados em baixa temperatura, apresentam bolsas flagelares maiores, às vezes com pequenas vesículas em seu interior (**Fig. 22 A, B**). Quando os parasitos foram incubados a 37°C, as vesículas de “sheddig” são observadas localizadas não só na região posterior do corpo do parasito (**Figs. 22C, D, F**), como também próximas à região da bolsa flagelar e no flagelo (**Fig. 22E**).

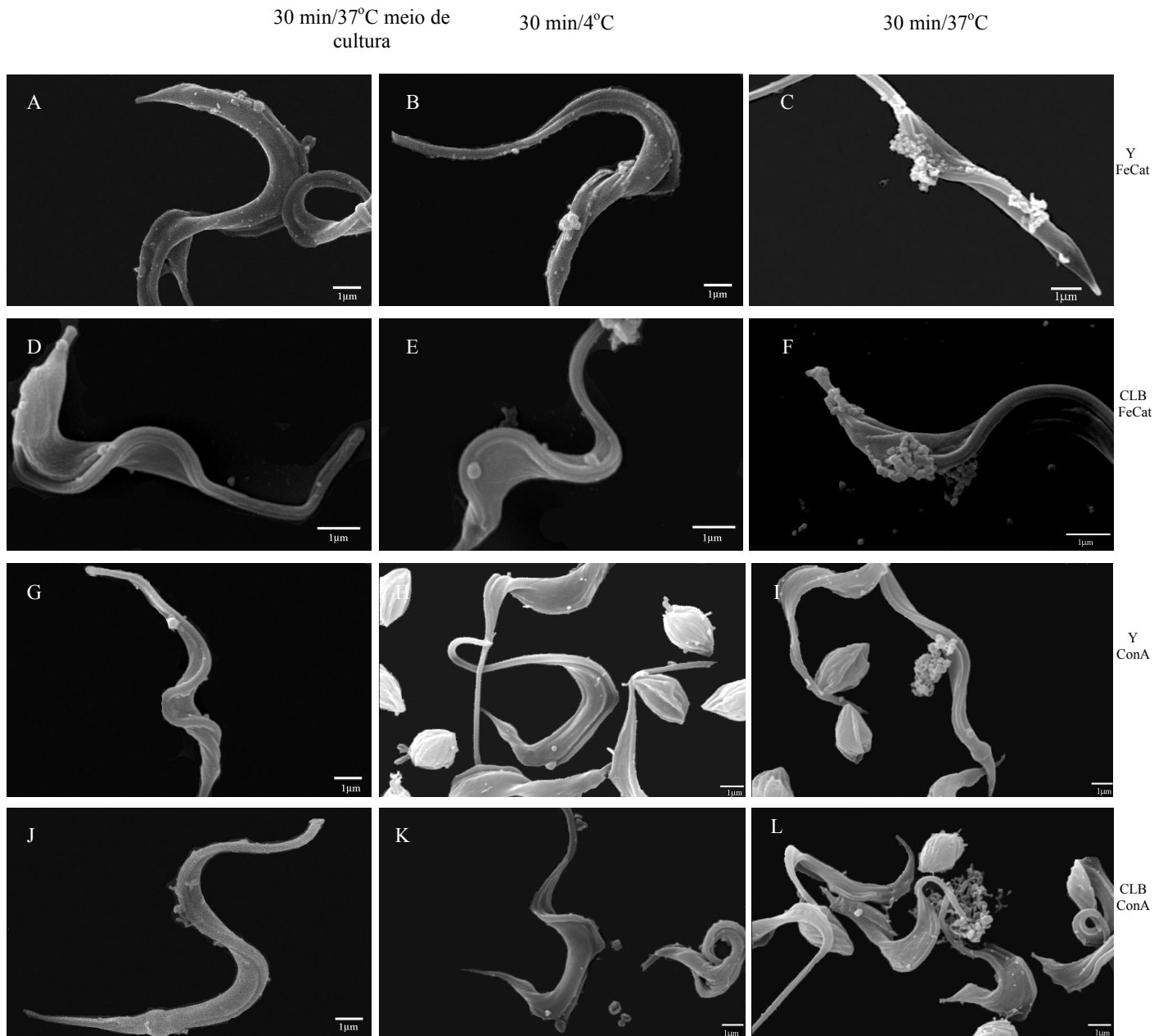


**Figura 21: Formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y incubadas na presença de IgG específica.** Parasitos da cepa Y incubados em presença de soro de paciente chagásico a 4°C, revelaram a presença de vesículas de “shedding”, próximo à saída (A, setas), ou no interior da bolsa flagelar (B, setas) e no meio extracelular (C, setas). A 37°C a presença de vesículas de “shedding” se mostrou ainda mais intensa (D-F). Vesículas com “coat” bem intenso, característico de membrana de amastigotas, também são observados no meio extracelular (E). No detalhe continuação da formação de vesículas (F, seta). F, flagelo; K, cinetoplasto; BF, bolsa flagelar. Barras de aumento correspondem a 0.2µm.



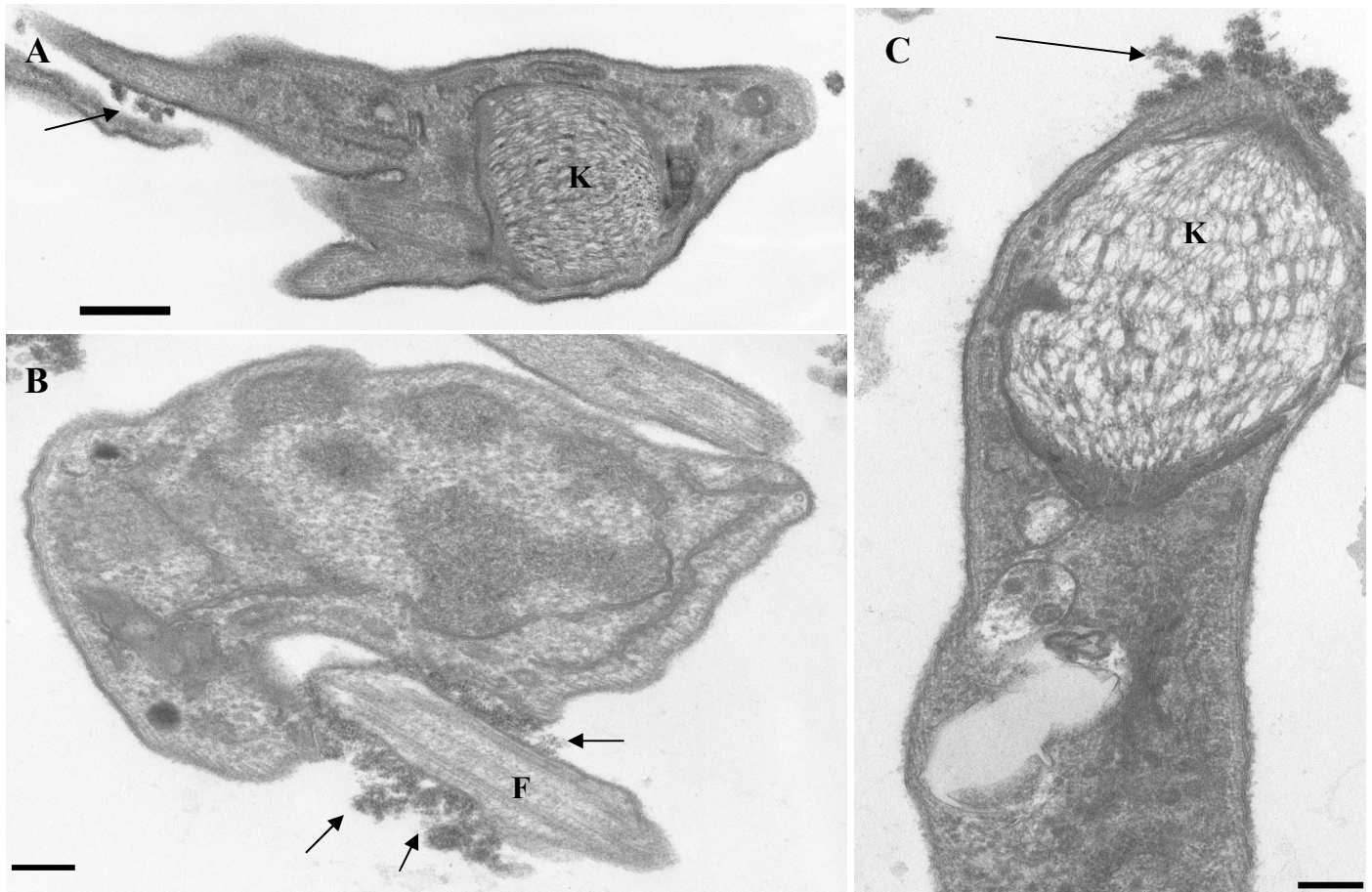
**Figura 22: Formas tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener incubadas na presença de IgG específica.** Parasitos do clone CL-Brener incubados em presença de soro de paciente chagásico a 4°C, revelaram a presença de bolsas flagelares maiores (A, B), às vezes com pequenas vesículas em seu interior (A, setas). A 37°C a presença de vesículas de “shedding” se mostrou ainda mais intensa (C-F). A localização das vesículas ocorreu tanto na região do flagelo (E), como na região posterior da célula (C, D, F - setas). F, flagelo; K, cinetoplasto. Barras de aumento correspondem a 0.2μm.

A fim de investigar a influência de FeCat e Con A neste processo, alguns experimentos foram realizados com a incubação de formas tripomastigotas na presença destas moléculas. Sob a visão do microscópio eletrônico de varredura, parasitos pertencentes à cepa Y incubados em presença de FeCat a 4°C, apresentam poucas vesículas grandes na região de saída da bolsa flagelar e algumas pequenas vesículas pelo corpo celular (**Fig. 23B**). Quando submetidos a uma segunda incubação a 37°C observamos um perfil de “shedding” bem mais intenso (**Fig. 23C**) quando comparados aos parasitos incubados a 4°C (**Fig. 23B**), indicando a importância da temperatura neste processo. Aglomerados nem sempre com aspecto de vesículas puderam ser detectados com frequência tanto na região da bolsa flagelar como também na região posterior do corpo do parasito (**Fig. 23C**). Quando analisadas ao MET, as células incubadas a 4°C confirmam a observação feita em imagens de varredura de FeCat sendo liberada da célula, na região de saída da bolsa flagelar (**Fig. 24A, B**), como também mostra este processo ocorrendo na parte posterior da célula (**Fig. 24C**). Após a incubação a 37°C, resultados obtidos através de MET, mostram perfis de membrana indicando a presença de liberação de FeCat em vesículas (**Fig. 25A**), assim como moléculas concentradas, sendo liberadas de uma maneira mais amorfa (**Fig. 25B-E**), de acordo com o observado previamente nas imagens de varredura. No caso do clone CL-Brener, imagens de varredura obtidas após incubação a 4°C na presença de FeCat mostram que as células raramente apresentam vesículas (**Fig. 23E**), observação confirmada em imagens de MET onde a marcação se manteve mais homogênea em todo o corpo celular do parasito (**Fig. 26A-C**), com poucos perfis de “shedding” (**Fig. 26A**). A 37°C, o número de células apresentando perfis de “shedding” foi maior e a presença de vesículas foi mais comum,

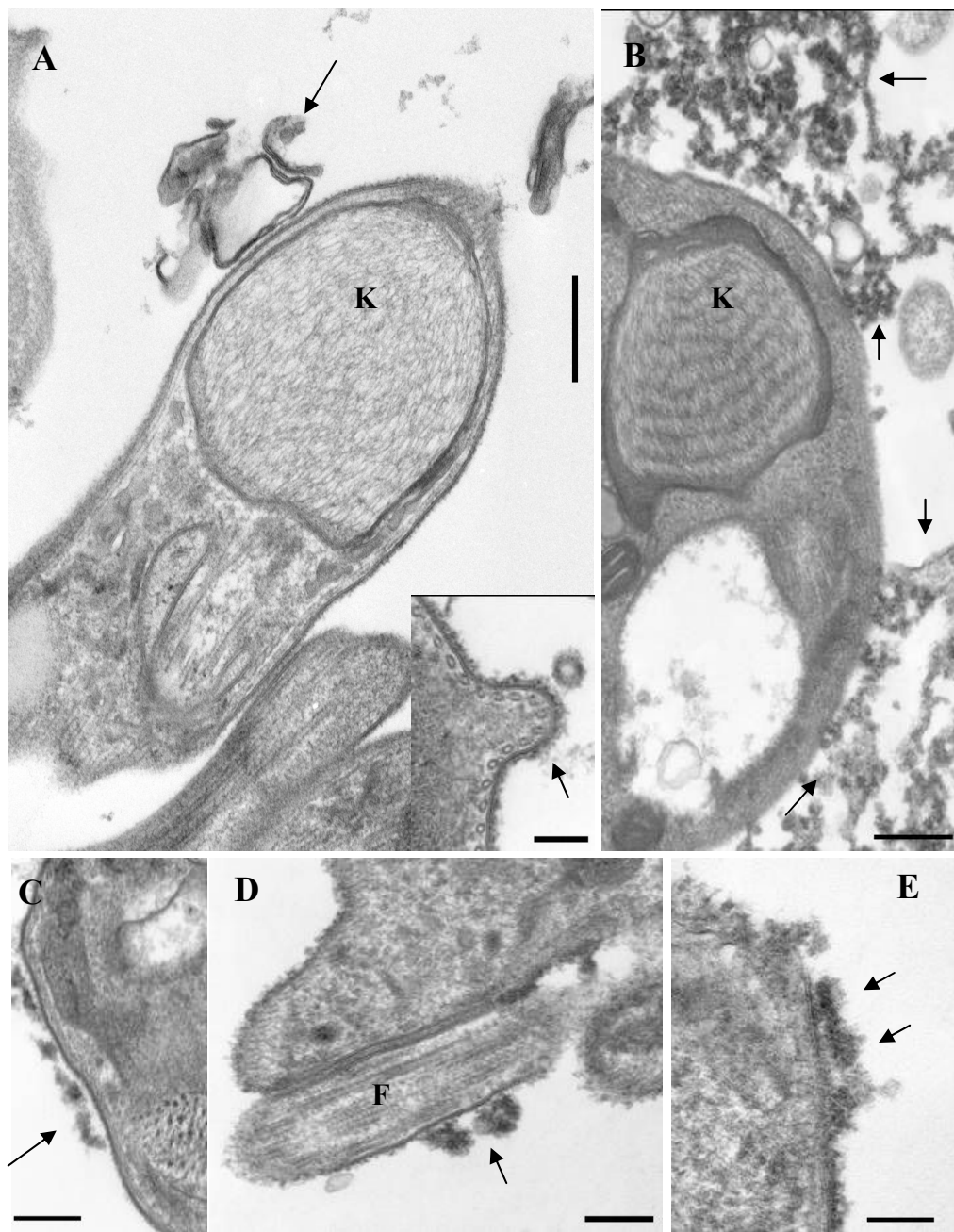


**Figura 23: Indução de “shedding” em tripomastigotas do *T. cruzi* por ferritina cationizada (FeCat) e Concanavalina A (Con A).** Formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y em ensaios realizados na presença de meio de cultura sem soro fetal bovino durante 30 minutos a 37°C (A) ou na presença de FeCat a 4°C (B) e a 37°C por mais 30 minutos (C). Experimentos realizados sob as mesmas condições acima com o clone CL-Brener (D-F). Formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y em ensaios realizados na presença de meio de cultura sem soro durante 30 minutos a 37°C (G) ou na presença de ConA a 4°C (H) e a 37°C por mais 30 minutos (I). Experimentos realizados sob as mesmas condições acima com o clone CL-Brener (J-L). As barras de aumento correspondem a 1µm.





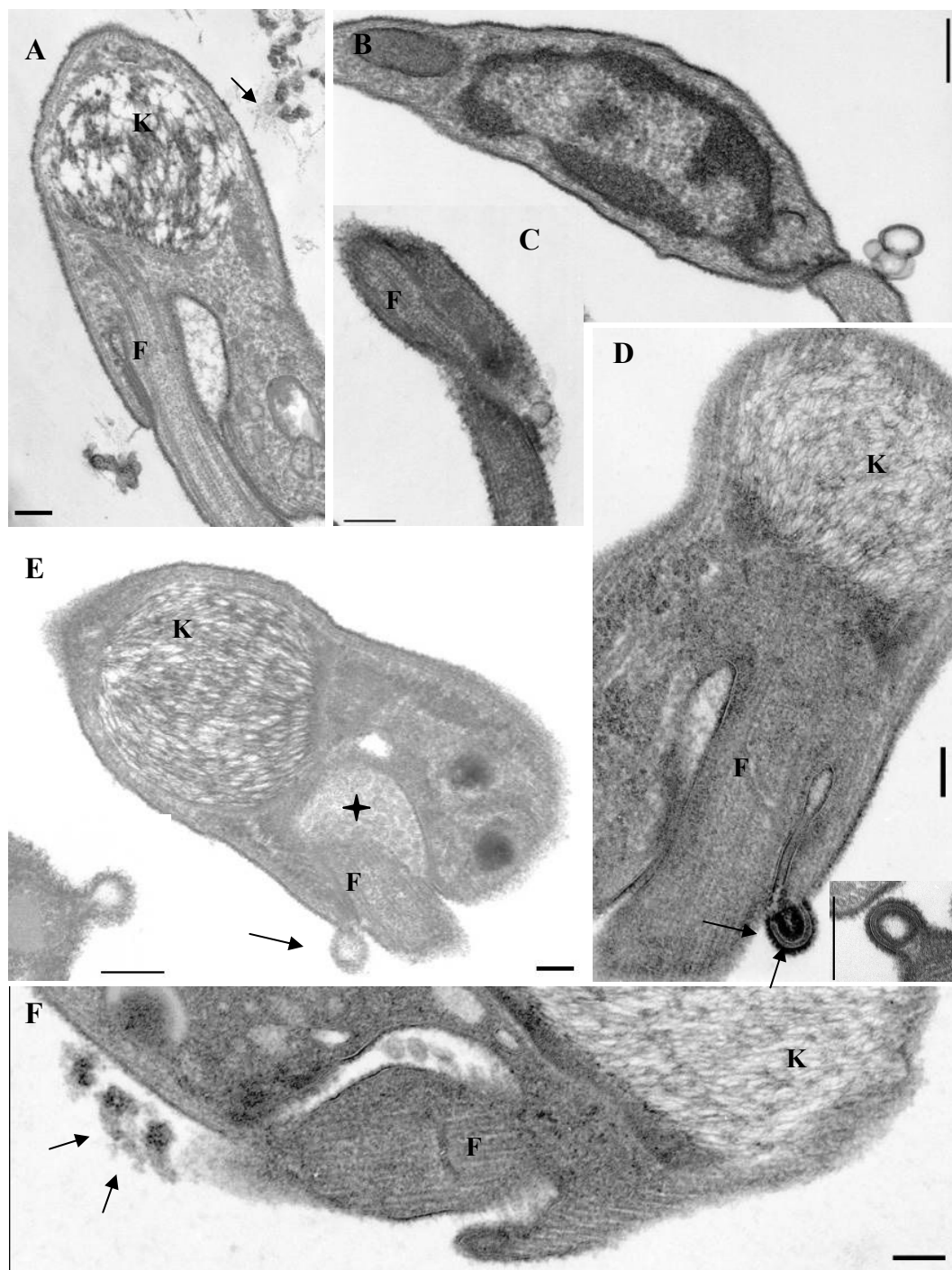
**Figura 24: “Shedding” em formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y incubadas na presença de ferritina cationizada.** Parasitos da cepa Y incubados durante 30 minutos a 4°C indicam a ocorrência de “shedding”. (A, B - setas) O processo pôde ser observado tanto na saída da bolsa flagelar, como também na superfície da região posterior do parasito (C, seta). K, cinetoplasto; F, flagelo. As barras correspondem a 0,2μm



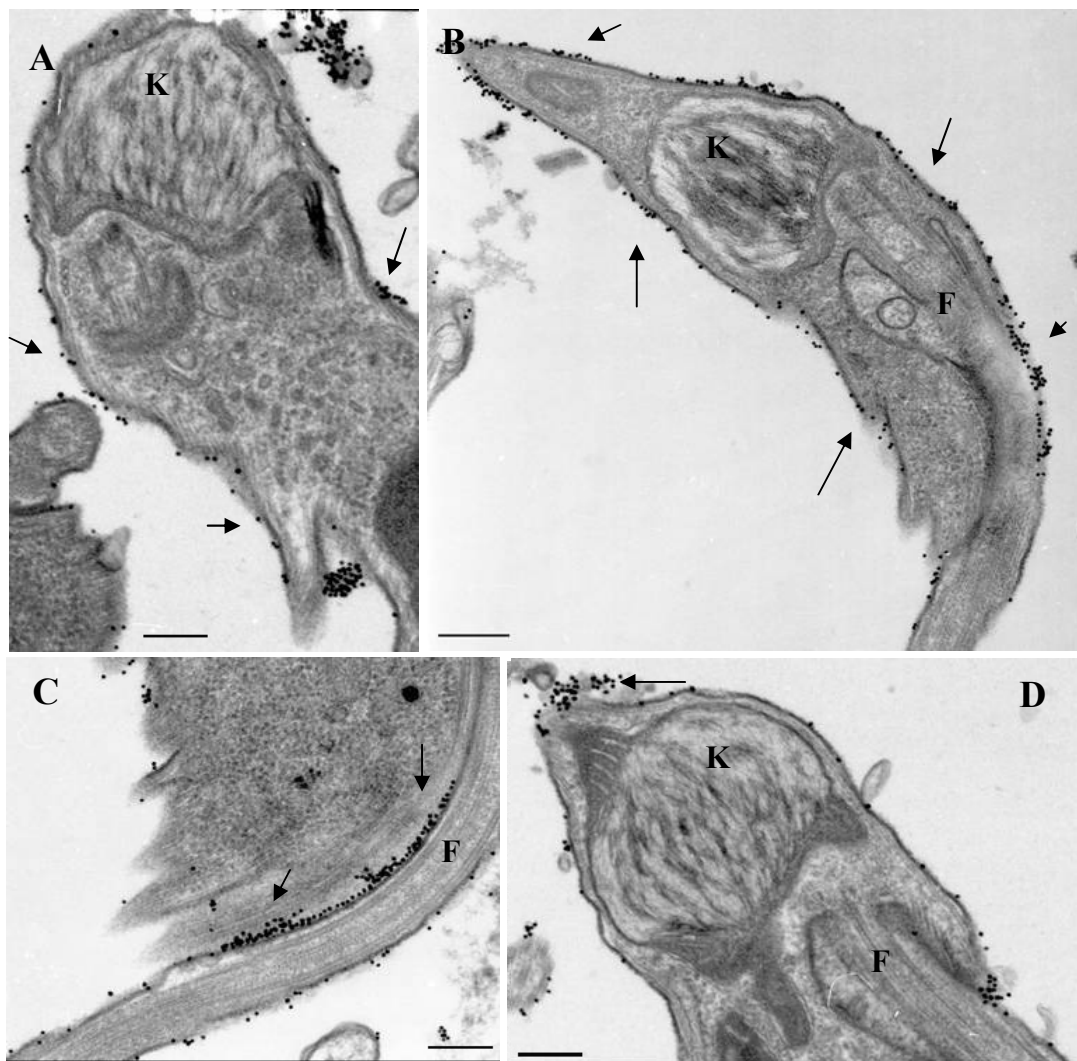
**Figura 25: “Shedding” em formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y incubadas na presença de ferritina cationizada a 37°C.** Nesta temperatura a liberação de moléculas através do “shedding” é mais intensa do que a 4°C. Perfis de membrana são observados (A, seta), indicando a formação de vesículas (inset, seta). A liberação de FeCat também pode ser observada em aglomerados com aspecto mais amorfo (B-E, setas). F, flagelo; K, cinetoplasto. As barras correspondem a 0,2μm

principalmente na região da bolsa flagelar (**Fig. 23F**). Imagens de MET mostram que praticamente nenhuma marcação de FeCat é detectada no corpo do parasito e a liberação desta marcação não é tão visível quanto na cepa Y (**Fig. 26D-F**). No entanto, indícios de formação de vesículas (**Fig. 26D,E**) assim como a liberação de aglomerados de FeCat podem ser observados na região de saída da bolsa flagelar (**Fig. 26F**).

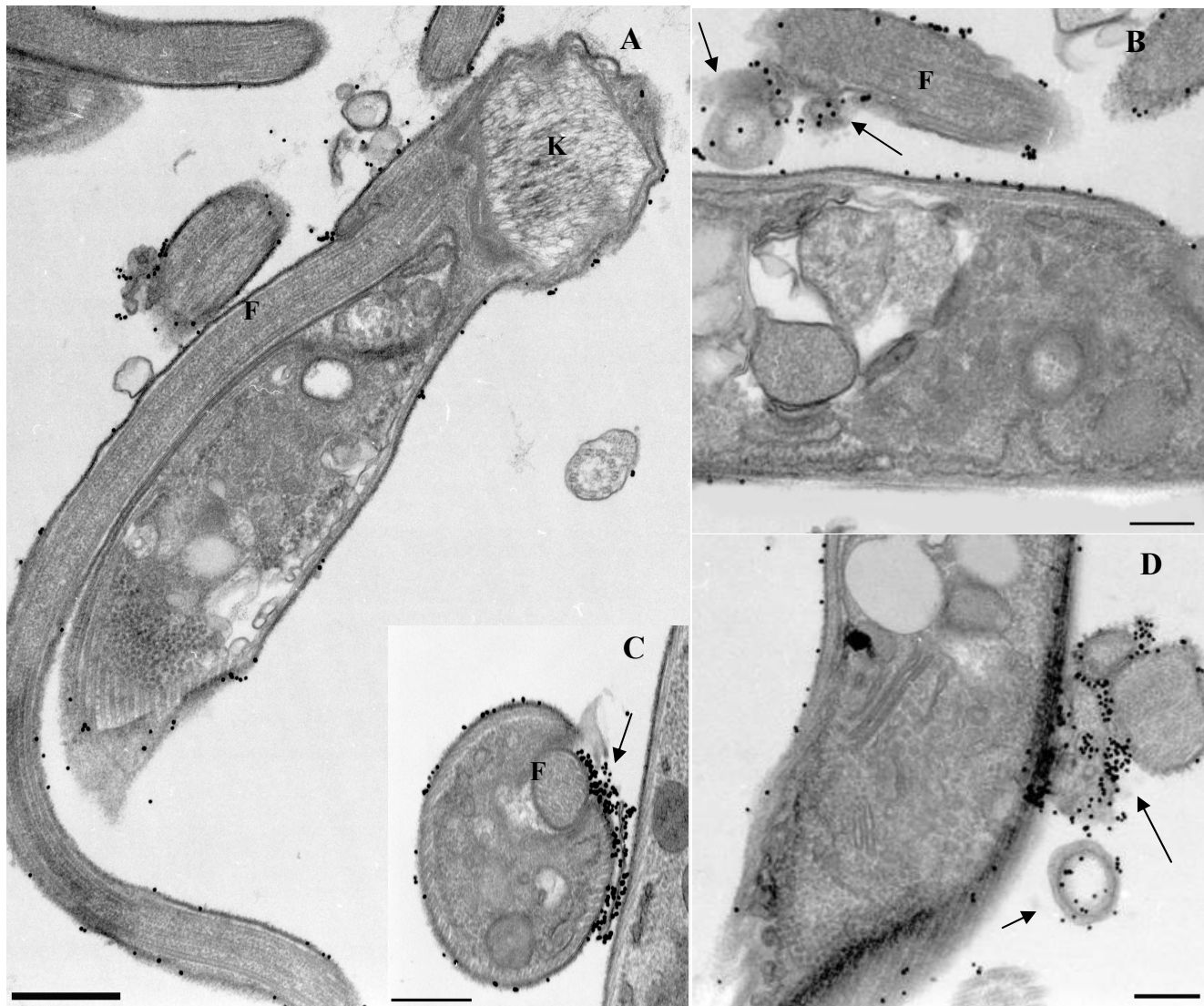
Quando a incubação das formas tripomastigotas foi realizada em presença de Con A a 4°C, parasitos da cepa Y raramente apresentaram vesículas em sua superfície quando analisadas ao MEV (**Fig. 23H**). Uma vez incubadas a 37°C, algumas células apresentaram um aumento de perfis de “shedding” em relação às células incubadas a 4°C (**Fig. 23I**). Imagens obtidas no MET de tripomastigotas após incubação a 4°C, revelaram uma marcação em torno do corpo celular (**Fig. 27A, B**), na porção mais externa da região de adesão do flagelo com o corpo celular (**Fig. 27C**), ou ainda concentrada em pequenas regiões da saída da bolsa flagelar e da membrana na parte posterior da célula, indicando um início de liberação desta marcação (**Fig. 27D**). Após o aumento da temperatura de incubação, as células continuaram a apresentar marcação por todo o corpo celular (**Fig. 28A**), no entanto, marcações mais intensas puderam ser verificadas em vesículas próximas ao flagelo (**Fig. 28B,D**) e na saída da bolsa flagelar (**Fig. 28C**). Tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener analisadas ao MEV, aparentemente apresentaram comportamento bastante semelhante à cepa Y frente a incubação na presença de Con A a 4°C ou 37°C (**Figs. 23K, L**). No entanto, quando analisadas ao MET, partículas de ouro coloidal são facilmente observadas por toda a região de adesão do flagelo ao corpo celular (**Fig. 29A**). Imagens sugerindo a liberação da marcação através do “shedding” já podem ser detectadas mesmo em baixa temperatura (**Fig. 29B**). Partículas de ouro



**Figura 26: “Shedding” em formas tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener incubadas na presença de ferritina cationizada.** Parasitos da cepa Y incubados durante 30 minutos a 4°C indicam uma marcação mais homogênea pelo corpo celular (A-C), com ligeira liberação de FeCat (A, seta). Com o aumento da temperatura, a marcação é bem menos intensa (D-F). Indícios da formação de vesículas de shedding podem ser observados (E, seta- inset), além de uma bolsa flagelar maior (E, ✦); em algumas células a projeção de alças de membrana também podem ser observadas (D, seta- inset). A liberação de conteúdo amorfo também é detectada (F, setas). F, flagelo; K, cinetoplasto. As barras correspondem a: A, B, C, D, E e F = 0,3µm, insets = 0,2µm.



**Figura 27: “Shedding” em formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y na presença de concanavalina** A. Parasitos da cepa Y incubados durante 30 minutos a 4°C apresentaram frequentemente marcação por todo o corpo celular (A, B- setas). Partículas de ouro coloidal também puderam ser observadas na porção mais externa da região de adesão do flagelo ao corpo celular (C - setas), ou ainda concentradas na membrana da região posterior da célula (D- seta). F, flagelo; K, cinetoplasto. As barras correspondem a 0,3µm



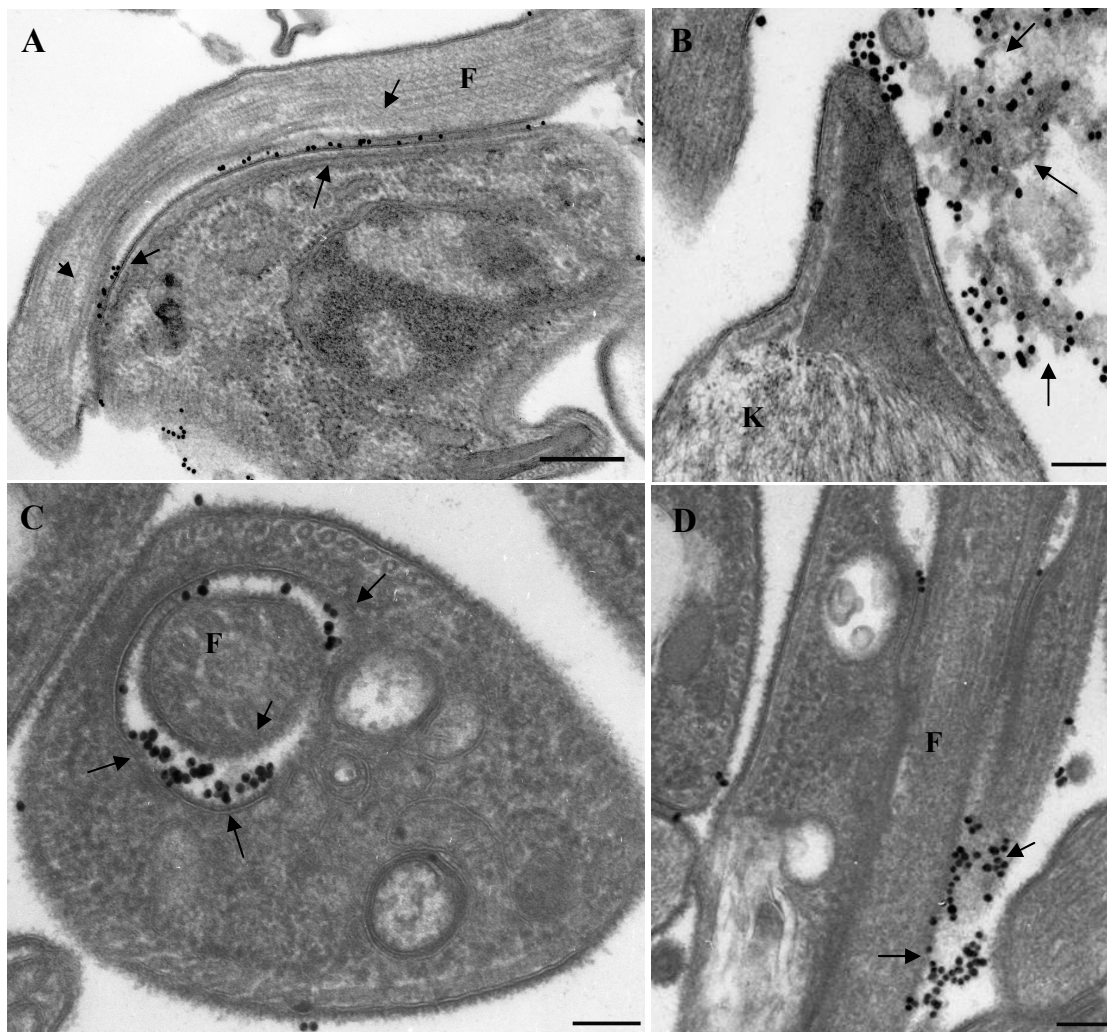
**Figura 28: “Shedding” em formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y na presença de concanavalina** A. Parasitos da cepa Y incubados durante 30 minutos a 37°C (A) continuam a apresentar marcação por todo o corpo celular. Nesta temperatura maiores quantidades de partículas de ouro foram detectadas em vesículas próximas ao flagelo (B,D -setas) e na saída da bolsa flagelar (C, seta). F, flagelo; K, cinetoplasto. As barras correspondem a 0,3μm

coloidal podem ainda ser verificadas no interior da bolsa flagelar e na saída desta estrutura (**Fig. 29C, D**). O corpo celular de tripomastigotas do clone CL-Brener não apresentou nenhuma marcação. A 37°C foi possível observar uma concentração bem maior de partículas de ouro, principalmente na saída da bolsa flagelar (**Fig. 30A-C**).

#### **4.3.2b. Análise da regulação do processo de “shedding” em formas tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener.**

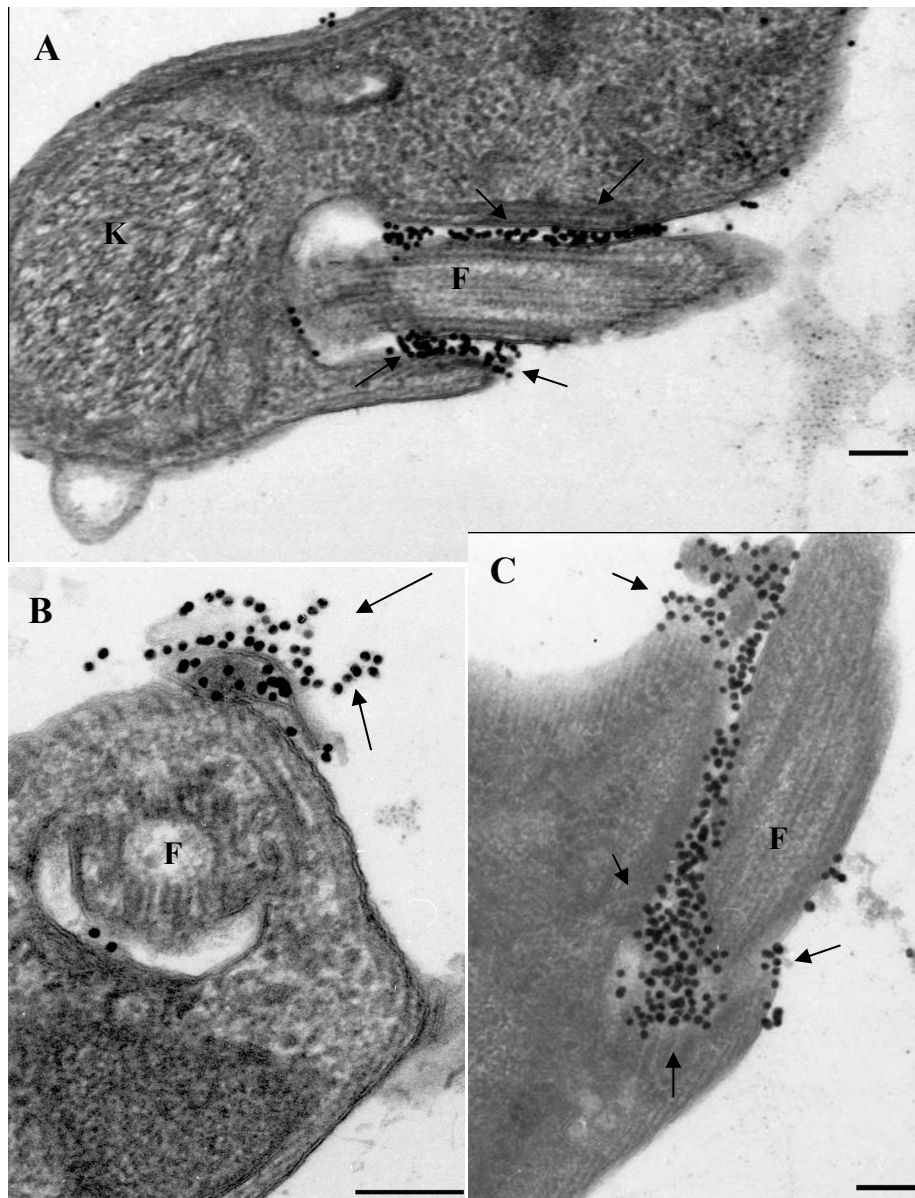
Existem pelo menos dois mecanismos básicos pelos quais o processo de “shedding” é ativado, tendo como modelo as células de mamíferos: (a) a ativação de proteína quinase C (PKC), que foi o primeiro mecanismo intracelular reconhecido como um alvo comum para a sinalização que gera o “shedding” de ectodomínios; e (b) a ação de metaloproteases e gelatinases no “shedding” de vesículas de membrana.

Para se desvendar os possíveis sinalizadores na regulação do processo de “shedding” em *T. cruzi*, utilizamos um ativador inespecífico de PKC, o forbol miristato acetato (PMA), um inibidor de metaloprotease (1,10 fenantrolina) e dois inibidores da síntese de ATP que são a azida e a 2-deoxi-glicose, estes últimos já utilizados com os mesmos propósitos em outras análises neste trabalho. Os experimentos foram realizados com formas tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener na presença de soro de paciente chagásico e de IgG não-específica. Tripomastigotas previamente incubados na presença de 1,10 fenantrolina ou de PMA por uma hora a 37°C e de azida e 2-deoxi-glicose por 30 minutos à mesma temperatura, foram incubados por mais 30 minutos a



**Figura 29: “Shedding” em formas tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener na presença de concanavalina** A. Tripomastigotas incubados durante 30 minutos a 4°C apresentaram frequentemente marcação por toda região de adesão do flagelo ao corpo celular (A, setas). A liberação de partículas de ouro coloidal já pode ser observada nesta temperatura, ocorrendo na região posterior da célula (B - setas), no interior (C, seta) ou na saída da bolsa flagelar (D- seta). F, flagelo; K, cinetoplasto. As barras correspondem a 0,3µm.





**Figura 30: “Shedding” em formas tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener na presença de concanavalina A.** tripomastigotas incubados durante 30 minutos a 37°C apresentaram marcação mais intensa (A-C), principalmente na saída da bolsa flagelar (*setas*). F, flagelo; K, cinetoplasto. As barras correspondem a 0,3µm.

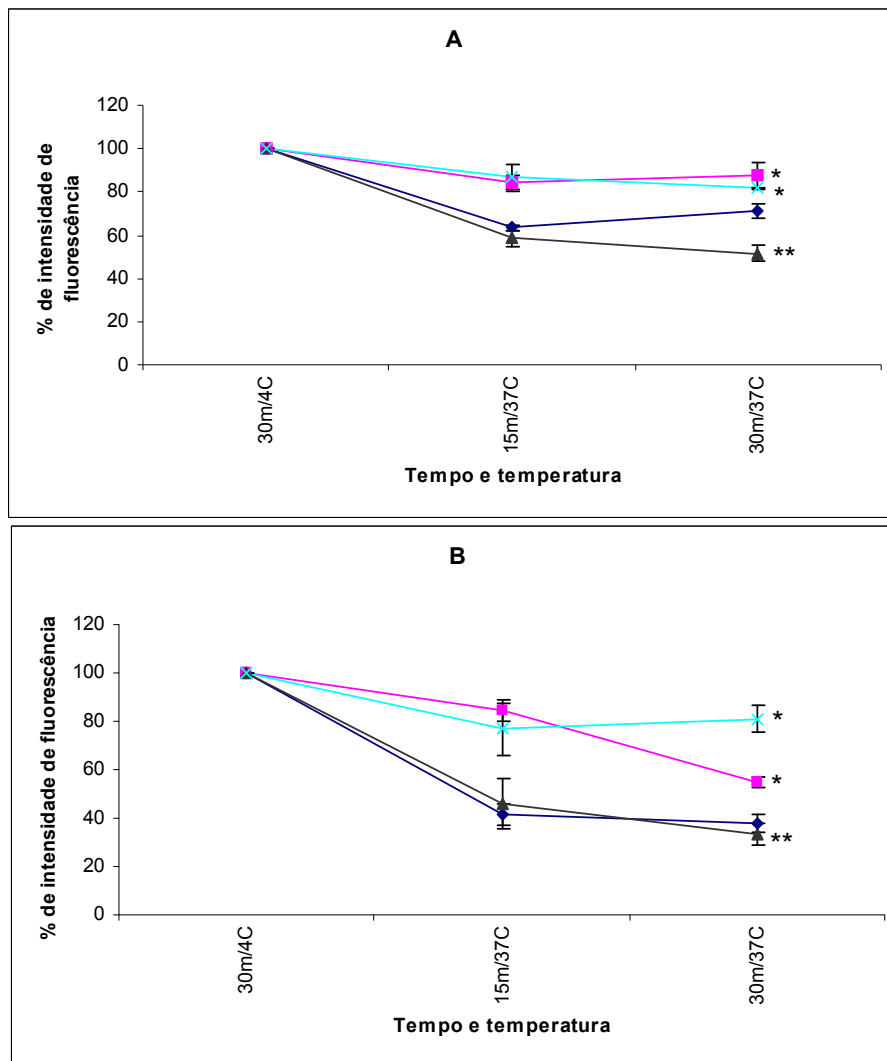
4°C na presença de IgG específica ou não-específica. Após este período, a temperatura foi elevada para 37°C e amostras foram recolhidas após 15 e 30 minutos.

Tripomastigotas pertencentes à cepa Y quando incubados na presença de IgG específica, apresentaram uma redução na intensidade de fluorescência de 36,5 e 29% após 15 e 30 minutos, respectivamente (**Fig. 31A**). O tratamento com azida e 2-deoxiglicose inibiu de maneira significativa o decaimento da fluorescência da superfície dos parasitos após 15 (13,5%) e 30 (18%) minutos de incubação a 37°C. O pré-tratamento com PMA induziu uma pequena ativação do processo de “shedding” após 15 minutos, que foi ampliada após 30 min a 37°C, quando a intensidade de fluorescência medida nos parasitos foi 45% menor do que aquela medida a 4°C. Em relação às células controle, após 30 min a 37°C, os parasitos tratados com PMA apresentaram uma perda de apenas 20% em relação à intensidade de fluorescência medida. Amostras pré-tratadas com fenantrolina, apresentaram uma inibição significativa no processo em ambos os tempos analisados, chegando a uma inibição de 20,9 e 16,5% após 15 e 30 minutos de incubação a 37°C, respectivamente em relação ao controle.

Quando analisamos o “shedding” de IgG específica por tripomastigotas do clone CL-Brener vemos que a intensidade de fluorescência das células controle decai muito mais rapidamente do que foi observado nos tripomastigotas da cepa Y (**Fig. 31B**). O decaimento da fluorescência é acentuado nos primeiros 15 min, praticamente se estabilizando nos restantes 15 min do experimento. Observamos que após 15min a 37°C a intensidade de fluorescência das células controle é 55% menor do que a intensidade observada após incubação a 4°C. Nos outros 15 min a 37°C a intensidade de fluorescência não se modificou. A azida juntamente com a 2-deoxyglicose tem uma ação

muito mais estabilizadora do processo de “shedding” em parasitos do clone CL-Brener. Há um decaimento nos primeiros 15 minutos de incubação, que é estabilizado no tempo de 30 minutos a 37°C quando a intensidade de fluorescência medida nas células tratadas com azida e 2-deoxiglicose é cerca de 10% menor do que a observada após a incubação a 4°C. O PMA não exerce nenhum efeito sobre o processo de “shedding” uma vez que a curva é idêntica à apresentada pelas células controle. A fenantrolina mostrou uma inibição de 42% em relação ao controle no tempo de 15 minutos, que vai se reduzindo durante o tempo do experimento. Após 30 minutos a 37°C a inibição causada pela fenantrolina é de 17,2% em relação ao controle (**Fig. 31B**).

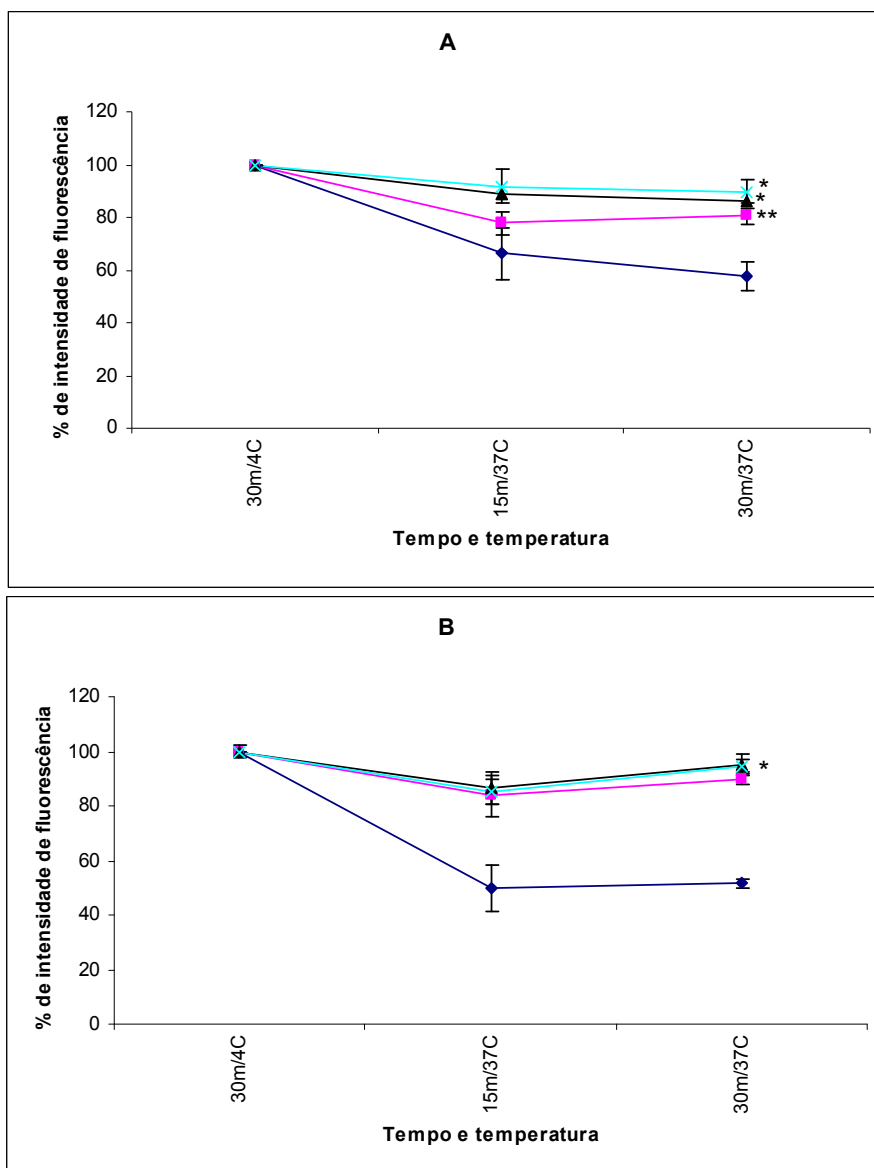
A redução na intensidade de fluorescência associada a superfície de tripomastigotas da cepa Y incubados com IgG-FITC não-específica foi de 33,7 e 42,4% para os tempos de 15 e 30 minutos a 37°C, respectivamente quando relacionado aos valores medidos após incubação a 4°C. Esses valores são mais acentuados do que aqueles observados após a incubação com o anticorpo específico, o que pode ser facilmente verificado pela inclinação da curva nos gráficos das Figs. 31A e 32A. Inibidores da produção de ATP, o PMA e a fenantrolina inibem o “shedding” de anticorpos não específicos, embora esta inibição seja significativa apenas após 30 minutos a 37°C. Ao contrário do observado na cepa Y, o “shedding” de anticorpos não específicos por tripomastigotas do clone CL-Brener é menos acentuado (50% do total da fluorescência) (**Fig. 32B**) do que aquele observado para os anticorpos específicos (aproximadamente 60% do valor inicial). Os três tratamentos efetuados reduzem igual e significativamente o “shedding” de anticorpos não específicos da superfície de tripomastigotas do clone CL-Brener (**Fig. 32B**). A tabela IV resume os dados dos experimentos descritos acima.



Y

CL-Brener

**Figura 31: Análise quantitativa do processo de “shedding” em formas tripomastigotas na presença de IgGs específicas contra o *T. cruzi*.** Formas tripomastigotas da cepa Y incubados na presença de soro de paciente chagásico e em seguida com IgG-Alexa546 (cabra anti-humano) (A) apresentaram aproximadamente 60% de decréscimo na intensidade de fluorescência (◆). Na presença de fenantrolina o “shedding” foi significativamente reduzido (■). O tratamento com PMA (▲) promoveu um ligeiro aumento no processo, enquanto na presença de azida sódica e 2-deoxyglycose (\*) houve inibição do processo, \* $p < 0,05$ , 15,30 minutos; \*\* $p < 0,05$ , 30 minutos; tripomastigotas do clone CL-Brener incubados sob as mesmas condições descritas acima (B) apresentaram uma queda da fluorescência semelhante que aos da cepa Y (◆). De maneira similar, o tratamento com fenantrolina (■) e com azida sódica e 2-deoxyglycose (\*) também inibiu o processo, enquanto com PMA (▲) o “shedding” ocorreu conforme o controle, \* $p < 0,05$ , 15,30 minutos; \*\* $p > 0,05$ , 30 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão.



Y

CL-Brener

**Figura 32: Análise quantitativa do processo de “shedding” em formas tripomastigotas na presença de IgG não-específica.** Formas tripomastigotas da cepa Y incubadas na presença de IgG-Alexa 488 (cabra anti-coelho) (A) apresentaram aproximadamente 40% de decréscimo na intensidade de fluorescência (♦). Na presença de fenantrolina o “shedding” foi significativamente inibido (■). O PMA (▲), assim como a azida sódica e 2-deoxyglicose (\*) também causaram inibição do processo, \* $p < 0,05$ , 15,30 minutos; \*\* $p < 0,05$ , 30 minutos; tripomastigotas do clone CL-Brener incubados sob as mesmas condições descritas acima (B) apresentaram uma queda da intensidade de fluorescência de 5 a 10% maior que os da cepa Y (♦). De maneira similar, o tratamento com fenantrolina (■), PMA (▲) ou azida sódica e 2-deoxyglicose (\*) também inibiu o processo, \* $p < 0,05$ , 15,30 minutos. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média está representada com desvio padrão

**Tabela IV: Análise da regulação do processo de “shedding” em formas tripomastigotas frente IgGs específicas ou não-específicas.**

<b>Condições</b>	<b>IgG específica</b>		<b>IgG não-específica</b>	
	<i>Cepa Y</i>	<i>Clone CL-Brener</i>	<i>Cepa Y</i>	<i>Clone CL-Brener</i>
PMA	Estimula	Não interfere	Inibe	Inibe
Fenantrolina	Inibe	Inibe	Inibe	Inibe
Azida + 2-deoxi-glicose	Inibe	Inibe	Inibe	Inibe

## *Discussão*

---

A modulação da superfície celular é um importante mecanismo que facilita a interação de parasitos intracelulares com células hospedeiras e o seu escape do sistema imunológico. Moléculas presentes na superfície celular têm grande participação, sejam elas sintetizadas pelo parasito, ou adquiridas a partir do hospedeiro. A ligação de imunoglobulinas do tipo G (IgG) e M (IgM) não-específicas à membros patogênicos da família *Trypanosomatidae* foi previamente descrita em vários estudos (BALBER & STUTERVAN, 1986, BOGUCKI & SEED, 1978, BUTCHER ET AL, 1990, CICARELLI & DANIEL LOPES, 1989, DIFFLEY, 1978, DIFFLEY & HONIGBERG, 1978, MIRANDA SANTOS & CAMPOS NETO, 1981,1995). Esta ligação ocorre através de receptores presentes na superfície dos parasitos capazes de reconhecer a porção Fc de imunoglobulinas, sejam de humanos ou de outros animais (SCHMUÑIS et al., 1978; MIRANDA SANTOS & CAMPOS NETO, 1981; CAMPO-NETO et al., 2003), o *T.cruzi* também apresenta uma proteína de 52 KDa que se liga fortemente à IgG através de sua porção Fab (CICARELLI & DANIEL LOPES, 1989).

Em 2003, Campos-Neto e colaboradores caracterizaram o gene *Lmsp1* que codifica para uma proteína de 16.6 KDa, associada à superfície de todas as formas evolutivas de *Leishmania* e *Trypanosoma*, como um receptor capaz de se ligar tanto à porção Fc quanto à Fab de imunoglobulinas. Apesar de detectados e caracterizados, não há relatos de estudos a respeito da afinidade destes receptores. Decidimos então neste trabalho, realizar experimentos de saturação no sentido de se esclarecer a afinidade desta ligação. Diferentes formas evolutivas, pertencentes à diferentes populações foram utilizadas. Os resultados obtidos através da análise por citometria de fluxo, sugerem que a ligação de imunoglobulinas não-específicas à superfície de formas epimastigotas do *T.*



*cruzi* ocorre com uma afinidade significativa, ou seja, característica de ligações específicas. Considerando-se que estas formas evolutivas possuem intensa atividade endocítica e são modelo de estudo para um maior conhecimento da via endocítica no *T. cruzi*, estes resultados indicam que no estudo da via endocítica mediada por receptor, moléculas de IgGs podem ser utilizadas como traçador. No entanto, quando diferentes populações são comparadas, formas epimastigotas pertencentes ao clone CL-Brener apresentam receptores com maior afinidade do que as mesmas formas evolutivas da cepa Y. A localização dos sítios de ligação de IgGs não-específicas observada, indica que estas moléculas se ligam às formas epimastigotas e são endocitadas, podendo ser utilizadas como traçador no estudo da via endocítica mediada por receptores.

Ainda não se conhece o número de receptores de diferentes tipos que existem no citóstoma e se algum deles possui características multiligantes. Algumas proteínas interiorizadas através de receptores presentes no epitélio do túbulo renal, como albumina, proteínas cationizadas, drogas polibásicas, cadeias leves de imunoglobulinas, e  $\beta_2$ -microglobulina (MOESTRUP, 1994, SAITO et al, 1994), também já foram observadas em *T. cruzi* (PORTO-CARREIRO, 2000, SOARES AND DE SOUZA, 1991, SOARES, SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1992). Neste sentido, experimentos em presença de BSA também foram realizados na tentativa de observarmos se a ligação destas moléculas pode ocorrer através de receptores e como seria esta afinidade de ligação. Inicialmente, as curvas de saturação obtidas em formas epimastigotas tanto da cepa Y quanto do clone CL-Brener, sugerem que a ligação de BSA atinge uma saturação em presença de 50 $\mu$ g/ml desta molécula. No entanto, os ensaios de competição não mostram nenhum deslocamento da curva de intensidade de fluorescência, apontando para a existência de

uma ligação não-específica. Estudos anteriores utilizam a BSA para identificar o processo endocítico de fase fluída (DE SOUZA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALES-ROBBLES, 1978; SOARES & DE SOUZA, 1991), sendo assim, uma possível hipótese para estes resultados seria que estas moléculas se ligam à superfície de formas epimastigotas por simples adsorção. Uma outra possibilidade seria a de que estaríamos observando um outro receptor de menor especificidade, que atua portanto na ligação de concentrações bem mais altas de BSA e por isso não estão sendo detectados nestes experimentos.

Formas tripomastigotas, importantes de serem estudadas por serem a forma infectiva ao hospedeiro vertebrado também foram analisadas. Os resultados obtidos indicam que a ligação de IgGs na superfície de tripomastigotas ocorre com afinidade característica de uma ligação específica em ambas amostras testadas. No entanto, esta ligação acontece com maior afinidade em parasitos pertencentes à cepa Y. Sabe-se que a ligação destes receptores à moléculas de imunoglobulinas do hospedeiro é capaz de ajudar no escape da ação do sistema complemento, assim como é capaz de facilitar a invasão destes parasitos na célula hospedeira (CUNA, KIERSZENBAUM & WIRTH, 1991; MIRANDA-SANTOS & CAMPOS NETO, 1995). Sendo assim, a diferença de afinidade observada na ligação de IgG em formas tripomastigotas da cepa Y pode estar relacionada ao menos em parte, com o fato da maior virulência observada nestes parasitos em relação às formas tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener. A localização dos sítios de ligação indica resultados semelhantes aos obtidos previamente em presença de IgGs específicas contra o parasito.

Receptores e outras proteínas podem apresentar-se ligadas à superfície celular de diferentes maneiras. Em células eucariotas, diversas proteínas são associadas à superfície externa da membrana citoplasmática através de ligação covalente à glicolipídeos contendo inositol. Estas âncoras são denominadas glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ENGLUND, 1993) e têm como função principal permitir uma associação estável entre proteínas e membrana (RALTON et.al, 1993). A primeira descrição da existência destas âncoras lipídicas foi feita em 1963, com a descoberta de que uma fosfolipase C bacteriana (PIPL-C) pode liberar de maneira seletiva a fosfatase alcalina da superfície de células de mamíferos (SLEIN, M.W. & LOGAN, G.F.JR, 1963). Em nosso trabalho, epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* foram incubados em presença de BSA ou IgG não-específica após tratamento com tripsina ou PIPL-C no sentido de identificarmos a natureza desta ligação. Os resultados obtidos indicaram que a BSA se liga às formas epimastigotas em maior parte através de proteínas ancoradas via GPI à membrana citoplasmática, uma vez que foi possível observar uma maior redução da marcação após o tratamento com PIPL-C quando comparada àquela obtida após tratamento com tripsina. Provavelmente pelo fato de que nestas formas evolutivas a ligação de moléculas a serem endocitadas se restringem à região do citóstoma, onde a grande maioria das proteínas se apresentam ancoradas via GPI. Formas tripomastigotas no entanto, apresentaram resultados contrários em relação aos epimastigotas. Em tripomastigotas a ligação de BSA se dá preferencialmente através de proteínas não ancoradas. Estes resultados nos sugerem que a ligação de BSA ocorre de maneira diferente dependendo da forma evolutiva do *T. cruzi*, talvez por se ligarem a proteínas mais comuns presentes na superfície de cada forma. Quando os experimentos foram realizados na presença de IgG não-específica os

resultados obtidos indicaram uma ligação mais frequente à proteínas ancoradas via GPI nas duas formas evolutivas analisadas. Como já foram detectados e isolados receptores capazes de se ligar tanto à porção Fc quanto à porção Fab de imunoglobulinas (CAMPO-NETO et al., 2003), e no presente trabalho foi possível observarmos que esta ligação ocorre com grande especificidade, pode ser que os resultados obtidos com os tratamentos enzimáticos indiquem que estes receptores possam ser moléculas associadas à superfície celular via âncoras de GPI, como ocorre em alguns tipos de receptores para Fc em neutrófilos humanos. No caso de formas tripomastigotas, o tratamento com tripsina revelou uma maior ligação de IgGs não-específicas em relação ao controle, sugerindo que a tripsinização pode revelar sítios de ligação à IgG mais próximos à superfície celular antes não expostos.

Para coexistirem, hospedeiros e parasitos precisam se adaptar uns aos outros, neste sentido mecanismos de escape desenvolvidos pelos parasitos são bastante importantes. Entre eles, a aquisição de antígenos, como fatores do soro, antígenos de histocompatibilidade entre outros já foram descritos (MIRANDA-SANTOS & CAMPOS NETO, 1995). A ligação de imunoglobulinas de hospedeiros à receptores Fc é capaz de ajudar no escape do sistema complemento, facilitando assim a invasão do parasito às células hospedeiras (MIRANDA-SANTOS & CAMPOS NETO, 1995). Tripomastigotas são as formas infectivas de células hospedeiras e portanto as causadoras da Doença de Chagas, desta maneira tornando de grande importância os resultados obtidos a respeito da especificidade da ligação de imunoglobulinas não específicas aos receptores Fc.

As formas epimastigotas do *T. cruzi* são as formas evolutivas presentes no intestino do inseto vetor. Por possuírem grande atividade endocítica são células

importantes para a realização de estudos da via endocítica do parasito. Em Tripanosomatídeos a endocitose de fase fluida e mediada por receptores foi descrita baseada no uso de moléculas definidas como traçadores endocíticos em células de mamíferos e do isolamento e caracterização de receptores para transferrina e LDL em *T. brucei* e *Leishmania*. No *T. cruzi* a presença destes receptores foi apenas sugerida com base na observação de saturação da ligação de transferrina e LDL (SOARES & DE SOUZA, 1991; LIMA & VILLALTA, 1990). Estas moléculas são interiorizadas apenas através do citóstoma e/ou da bolsa flagelar, o que confere aos Tripanosomatídeos a característica de células polarizadas (PORTO-CARREIRO et al., 2000). Dados a respeito da ultraestrutura da região do citóstoma mostram claramente um domínio diferenciado da membrana citoplasmática de epimastigotas do *T. cruzi*, onde diferentes tipos de moléculas são observadas ligadas sugerindo não só a existência de receptores específicos como também que nesta região estes receptores são mais abundantes (DE SOUZA, MARTINEZ-PALOMO & GONZALES-ROBBLES, 1978; PORTO-CARREIRO et al., 2000; PIMENTA et al., 1989). Na verdade, moléculas se ligam intensamente ao citóstoma independente da via endocítica realizada para que sejam interiorizadas pelo parasito.

Quando comparadas a quantidade endocitada de traçadores endocíticos de fase fluida Lucifer Yellow (LY) e BSA-Alexa-488, nós observamos que a BSA é interiorizada em maior quantidade em todas as amostras. A BSA e o LY se mostraram os melhores traçadores para o estudo da via endocítica nos clones CL-Brener e Dm28c, respectivamente, uma vez que a interiorização destes traçadores foi maior nestas amostras do que nas outras analisadas. Estas características são interessantes na hora de se escolher

um traçador para a realização de experimentos, como por exemplo, na avaliação de mudanças na atividade endocítica sob efeito de drogas.

Quando a análise comparativa da atividade endocítica utilizando-se a BSA-Alexa-488 como traçador foi realizada através de microscopia de fluorescência os resultados foram bem diferentes dos observados em citometria. As formas epimastigotas pertencentes à cepa Y se mostraram as melhores células para o estudo da atividade endocítica durante os primeiros 60 minutos, uma vez que o número de células e compartimentos marcados foi maior do que nas outras amostras. No entanto, epimastigotas pertencentes ao clone CI-Brener foram as melhores células para a realização de estudos da via endocítica em períodos de incubação mais longos uma vez que a percentagem de células marcadas foi maior. Este é um importante aspecto principalmente quando este processo é analisado através de cortes ultra finos em microscopia eletrônica de transmissão, onde as análises dependem do plano de corte da amostra e de um grande número de imagens para que o resultado seja estatisticamente confiável. Com um número maior de células marcadas, a probabilidade de que se consiga acompanhar de maneira mais fiel o estudo da via endocítica deste parasito é maior.

Imunoglobulinas específicas e não-específicas podem ser observadas na superfície de membros patogênicos da família *Trypanosomatidae*. O destino destas moléculas depende da forma evolutiva analisada. Elas podem ser interiorizadas, liberadas da superfície através de “shedding” de pequenas vesículas ou pode participar da entrada do parasito nas células hospedeiras e no escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro (GONÇALVES et al., 1991; KLOETZEL & DEANE, 1977; KRETTLI et al., 1979; MIRANDA-SANTOS & CAMPOS-NETO, 1995; CUNA; KIERSZENBAUM &

WIRTH, 1991; SCHMUÑIS et al., 1978; SCHMUÑIS et al., 1980). Imunoglobulinas não-específicas são concentradas na superfície de todas as formas evolutivas do *T. cruzi* através de ligações mediadas por receptores Fc (CAMPOS-NETO et al., 2003; MIRANDA-SANTOS & CAMPOS-NETO, 1981). A interiorização de imunoglobulinas não-específicas pelas formas epimastigotas foi observada através de moléculas conjugadas à dois tipos de fluorocromos: fluoresceína e Alexa Fluor-488. Esta última possui a vantagem de ter a relação proteína/marcação bem maior, sem queda da fluorescência. As diferenças observadas na intensidade de fluorescência analisada podem estar relacionadas à uma diferença de peso molecular dos conjugados, e conseqüentemente à sua acessibilidade aos sítios de membrana nas formas epimastigotas, ou, ainda, devido à diferença de relação proteína/marcação entre os conjugados. O decaimento da intensidade de fluorescência que observamos em parasitos do clone Dm28c e da cepa Y após 120 minutos de incubação (Fig. 10D), provavelmente ocorreu devido à extinção da fluorescência da FITC nos compartimentos da via endocítica.

Até então, nenhuma análise comparativa da endocitose por fase fluida ou mediada por receptores entre diferentes amostras do *T. cruzi* e utilizando diferentes traçadores havia sido realizada. Desta maneira esperamos ter contribuído na padronização de estudos da via endocítica com o *T. cruzi*.

Após a análise quantitativa e comparativa do processo endocítico de formas epimastigotas em presença de Igs não-específicas, decidimos observar o que acontecia com estes traçadores após um tempo mais longo de incubação, durante o ciclo desta célula. Após o período de pulso em presença de IgG-TRITC, as células foram cultivadas normalmente como de rotina e a cinética de longa duração da via endocítica foi avaliada.

Em formas epimastigotas do *T. cruzi*, o acúmulo do material endocitado ocorre em organelas denominadas reservossomas localizadas preferencialmente na região posterior (SOARES & DE SOUZA, 1988). Com os resultados observados através da microscopia de fluorescência foi possível observarmos que após o pulso de 4 horas, a IgG já havia atingido, na maior parte das células, o final da via endocítica, uma vez que os compartimentos marcados estavam concentrados em sua grande maioria na região posterior da célula, provavelmente em reservossomas. No entanto, após um período de caça de 72 horas, encontramos uma redução na porcentagem de células e de compartimentos marcados. Os resultados se confirmaram nas análises realizadas através de MET, onde foi possível observarmos que provavelmente com a divisão, parasitos marcados dão origem a parasitos não marcados, ou passem às células descendentes alguns dos compartimentos marcados, diminuindo por consequência o número de células e de compartimentos marcados na população.

O papel dos diferentes compartimentos intracelulares no controle do tráfego de vesículas no *T. cruzi*, vem sendo estudado. Alguns anestésicos locais como a dibucaína, foram descritos como inibidores da ativação de fosfolipase A<sub>2</sub> citoplasmática, independente de cálcio, resultando em uma inibição da fusão dos compartimentos intracelulares ao longo das vias endocítica e secretória e, portanto, acabando por diminuir a interiorização e/ou secreção de algumas moléculas (TOLLESHAUGH, TROND & HOLTE, 1982; HAGIWARA & OZAWA, 1990; BALBOA, SÁEZ & BALSINDE, 2003). O tratamento de formas epimastigotas do *T. cruzi* com dibucaína resultou na diminuição dos níveis de interiorização de BSA e IgG em até 60%, além de atrasar a exocitose de cisteíno proteinase (SOUTO-PADRÓN, LIMA & RIBEIRO, 2006). Apesar



de não inibir a fusão de compartimentos endocíticos, a degradação de complexos BSA-Au foi retardada, provavelmente devido à queda do tráfego de proteases em direção aos reservossomas (SOUTO-PADRÓN, LIMA & RIBEIRO, 2006). A atividade da PI<sub>3</sub>-quinase já foi descrita como tendo grande importância na regulação da endocitose de fase fluida (SHPETNER et al., 1996; CLAGUE et al., 1995). Ao contrário, outros estudos indicam que a ativação da enzima em questão não é necessária na endocitose mediada por receptores (SHEPHERD et al., 1995). No sentido de se observar a importância da PI<sub>3</sub>-quinase no processo endocítico de formas epimastigotas do *T. cruzi*, um análogo de quercetina (LY294002) capaz de inibir de maneira específica a ação da PI<sub>3</sub>-quinase foi utilizado em alguns experimentos. Resultados obtidos após análise em citometria de fluxo mostraram um deslocamento na curva de BSA em amostras pré-incubadas em presença de LY294002, sugerindo a importância da atividade de PI<sub>3</sub>-quinase na endocitose desta molécula e mais uma vez fortalecendo os indícios de que a BSA é endocitada através de fase fluida. Visando a análise do processo endocítico mediado por receptor, epimastigotas foram incubados em presença de IgG. Resultados obtidos nas amostras tratadas com o inibidor de PI<sub>3</sub>-quinase, indicam que nos epimastigotas do *T. cruzi* a atividade da enzima não parece ter grande importância na endocitose de IgG, somando assim mais evidências de que esta molécula é interiorizada através de endocitose mediada por receptores.

A superfície celular é localização bastante importante de vários tipos de interações. Os constituintes da membrana citoplasmática são continuamente renovados através de síntese, endocitose ou “shedding” (DANIAK, 1991). Além disso, o “shedding” de proteínas de superfície pode ser bastante importante na patogênese de diversas doenças (SBARBA & ROVIDA, 2002). Alterações morfológicas e imunológicas

detectadas em rim de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, foram atribuídas ao “shedding” de agregados de componentes de membrana reconhecidos por anticorpos específicos contra o parasito (CASTRO & RIBEIRO DOS SANTOS, 1977). Quando comparadas, células malignas são capazes de liberar componentes da membrana citoplasmática em um nível bem maior do que células normais do mesmo tipo (TAYLOR & BLACK, 1986). A liberação de antígenos associados à membrana podem proteger as células tumorais de moléculas efetoras do sistema imunológico, e por consequência da própria resposta imunológica (CURRIE & ALEXANDER, 1974).

Curiosamente, durante a análise de epimastigotas incubados na presença de IgG não-específica durante 30 minutos a 4°C através de microscopia eletrônica de transmissão, foi possível observar partículas de ouro coloidal ligadas à um material filamentosos e distante da superfície celular, assim como projetado na região do citóstoma semelhante a uma bolha, ou ainda associadas à vesículas, sugerindo que sítios de ligação de IgG presentes nestas formas evolutivas também podem ser liberadas através de “shedding”. Análises através de citometria de fluxo indicam a liberação de moléculas de IgG não-específicas através de “shedding” após 15 min de incubação a 28°C em ambas as populações testadas. Este processo foi intensificado após 15 min adicionais no período de incubação em formas epimastigotas pertencentes ao clone CL-Brener, enquanto células da cepa Y demonstraram uma pequena recuperação na intensidade de fluorescência sob as mesmas condições. Tal fato se deu possivelmente devido à recuperação das células em suas condições normais de metabolismo, permitindo que uma parte das IgGs ligadas à sua superfície fossem endocitadas. Como já foi dito anteriormente, esta forma evolutiva possui uma atividade endocítica bastante intensa, portanto é possível que a maior parte

das moléculas que se ligam na região do citóstoma sejam primeiramente endocitadas. Sendo assim, seria mais fácil explicar os baixos índices de “shedding” observados na forma epimastigota. No entanto, o que leva à célula a desencadear o processo de “shedding” ao invés de endocitar uma parte das moléculas ligadas, não sabemos.

A redistribuição de componentes de membrana, inclui a formação de agregados de proteínas em algumas regiões da superfície celular, processo conhecido como “capping” (NICOLSON, 1976). Uma das hipóteses existentes é que este processo no *T. cruzi* facilite a eliminação destes agregados formados a partir da superfície do parasito através do mecanismo de “shedding”. Apesar do “shedding” ter sido descrito como um processo espontâneo no *T. cruzi*, alguns resultados obtidos em estudos anteriores não excluem a possibilidade de que este processo possa ocorrer em níveis diferentes dependendo do antígeno ou ainda que possa ser estimulado na presença de algumas substâncias ou moléculas (GONÇALVES et al., 1991 ). O “capping” na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi* também foi observado em experimentos realizados em presença de Concanavalina A (SZARFMAN, QUEIROZ & DE SOUZA, 1980). Sendo assim, decidimos investigar a possível influência de Con A no processo de “shedding”. Experimentos realizados em presença de Con A sob as mesmas condições descritas anteriormente, mostraram uma curva de intensidade de fluorescência na superfície dos parasitos após 15 ou 30 minutos a 28°C semelhante à curva observada em análises feitas em presença de IgG, indicando que existe a liberação de Con A através de “shedding”, mas que esta molécula não é capaz de induzir um processo de “shedding” mais intenso em epimastigotas.

Tripomastigotas, as formas infectivas do *T. cruzi* também foram analisadas. Na presença de IgG não-específica, análises obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a temperatura tem grande importância no processo. A baixa temperatura, as vesículas de “shedding” foram observadas, principalmente na cepa Y. Estas estruturas se apresentaram concentradas, sugerindo que a baixa temperatura é capaz de retardar o processo. Após incubação a 37°C, a observação de vesículas de “shedding” foi bem mais frequente se comparada com tripomastigotas mantidos à baixa temperatura. Nestes casos, estas estruturas não se apresentaram tão concentradas e foram observadas também no meio extracelular. Parasitos incubados em presença de IgGs específicas, apresentaram vesículas mais dispersas, mas o comportamento em relação às diferentes temperaturas utilizadas durante os experimentos foi semelhante ao observado em presença de IgG não-específica. Com estes resultados, ficou claro também que o “shedding” observado em tripomastigotas após a incubação em presença de IgGs específicas ou não foi predominantemente de vesículas.

Outros estudos realizados anteriormente mostraram a existência tanto de “capping” quanto de “shedding” em *Leishmania amazonensis* mesmo a 4°C submetidas à incubações em presença de ferritina cationizada (SARAIVA et al., 1989). As análises de MEV de formas tripomastigotas da cepa Y incubadas em presença de FeCat a 4°C mostraram uma pequena quantidade de vesículas na região da bolsa flagelar, o que se confirmou em imagens obtidas através de MET onde se observa que a FeCat é liberada em grande parte por “shedding” de aglomerados destas moléculas. A 37°C o processo de “shedding” foi intensificado e aqui alguns indícios da presença de vesículas também foram observados. Em tripomastigotas do clone CL-Brener, liberação de FeCat já a baixa

temperatura não é frequente, o “shedding” é mais facilmente detectado a 37°C. Tripomastigotas pertencentes tanto à cepa Y como ao clone CL-Brener incubados em presença de Con-A à baixa temperatura raramente apresentam vesículas de “shedding”. A 4°C a localização da Con A é observada principalmente ao longo de todo o corpo celular na cepa Y, enquanto parasitos do clone CL-Brener mostraram uma marcação concentrada na região de adesão do flagelo com o corpo celular. Quando a temperatura de incubação foi aumentada para 37°C, imagens de MEV mostraram uma maior incidência de vesículas. A localização da marcação com Con A também foi distinta em ambas amostras, no entanto foi possível observar algumas vesículas marcadas, indicando que pelo menos uma parte da Con A é liberada através de “shedding de vesículas. Somados os resultados dos experimentos realizados em presença de Con A e FeCat, indicam que estas moléculas são liberadas da superfície de formas tripomastigotas e induzem um “shedding” mais intenso em relação ao que se é observado em células controle.

Tanto o “shedding” de ectodomínios quanto de vesículas de membrana, são processos já descritos em células de mamíferos (Taylor & Black, 1986; Dainiak, 1991; Sbarba & Rovida, 2002). Pelo menos dois mecanismos básicos de ativação do “shedding” foram descritos tendo como modelo as células de mamíferos: (a) a ativação de proteína quinase C (PKC), que foi o primeiro mecanismo intracelular reconhecido como um alvo comum para a sinalização que gera o “shedding” de ectodomínios; e (b) a ação de metaloproteases e gelatinases no “shedding” de vesículas de membrana. Neste trabalho decidimos realizar experimentos para a análise do “shedding” através de citometria de fluxo para obtermos um resultado quantitativo e para tentar entender melhor como ocorre a regulação deste processo. Na presença de IgG não-específica os resultados

obtidos mostram um constante decréscimo na intensidade de fluorescência quando os tripomastigotas são incubados por 15 ou 30 minutos a 37°C. Comparados com os resultados obtidos a partir de experimentos realizados em presença de IgG específica, verificamos que apesar de significativo, o perfil de “shedding” na presença de IgG não-específica foi aparentemente menos intenso, fato interessante uma vez que é de grande importância para os parasitos serem capazes de se livrar de maneira mais eficiente de anticorpos específicos contra eles, o que dificultaria a ação do sistema imunológico do hospedeiro. A influência da energia disponível neste processo foi testada em experimentos onde tripomastigotas foram pré-incubados em presença de inibidores da síntese de ATP. Os resultados revelaram um “shedding” bem menos intenso, sugerindo que para a ocorrência deste processo a disponibilidade de energia é um ponto importante, em ambas as amostras testadas em presença de IgG específica ou não.

Pesquisas anteriores realizadas em outros modelos de estudo mostraram que o 13-acetato de forbol 12-miristato (PMA) pode ser útil na indução do “shedding” de ectodomínios, através da ativação de proteína quinase C. Baseado nestes dados, testamos a influência do PMA no “shedding” em *T.cruzi*. Observamos um aumento no “shedding” de IgGs específicas após o tratamento com PMA apenas em tripomastigotas pertencentes à cepa Y e após 30 minutos de incubação a 37°C, o que não ocorreu com parasitos do clone CL-Brener. Resultados obtidos com tripomastigotas do clone CL-Brener incubados com IgGs específicas mostraram níveis de intensidade de fluorescência bastante similares entre o controle e as amostras tratadas com o PMA. Ao contrário, tripomastigotas de ambas as cepas testadas na presença de IgG não-específica, mostraram uma inibição do processo após o tratamento com PMA. A ativação de proteína quinase C (PKC) foi o

primeiro mecanismo intracelular reconhecido como um alvo comum para a sinalização que gera o “shedding” de ectodomínios. Sendo assim, é possível que a ativação do “shedding” em formas tripomastigotas em presença de IgGs específicas ocorra de maneira distinta entre as duas amostras testadas, e que na cepa Y este processo tenha como parte de sua sinalização, a ativação de PKC.

A ação de metaloproteases e gelatinases já foi descrita como importante na estimulação do “shedding” de vesículas de membrana (DOLO et al., 1994; CASSARA et al., 1998). Por sua vez, o “shedding” em *T. cruzi* já foi descrito como um processo espontâneo envolvendo vesiculação da membrana plasmática (GONÇALVES et al., 1991). Logo, um inibidor de metaloprotease foi também testado através da pré-incubação de tripomastigotas em presença de 1,10 fenantrolina. Análises de citometria de fluxo revelaram uma diminuição bastante significativa do “shedding” de IgGs específicas ou não em ambas as amostras testadas, sugerindo que no “shedding” de vesículas observado de maneira tão frequente em tripomastigotas do *T. cruzi* incubados em presença de IgGs específicas ou não, a participação de metaloproteases é de grande importância para a via de regulação assim como ocorre em células de mamíferos.

## *Conclusões Finais*

---



- A ligação de Igs não-específicas à superfície de formas epimastigotas ocorre com afinidade significativa, podendo ser utilizadas como traçadores no estudo da via endocítica mediada por receptores;
- Em formas tripomastigotas a afinidade de ligação também foi significativa, principalmente na cepa Y.
- O resultado da análise da ligação de Igs não-específicas após o tratamento de epimastigotas e tripomastigotas com PIPL-C dá evidências de que esta ligação pode ocorrer através de proteínas ancoradas via GPI.
  
- A BSA-Alexa se mostrou o melhor traçador para o estudo da via endocítica no clone CL-Brener;
- Mesmo após longos períodos de incubação não foi observada a formação de um único compartimento residual, além disso, compartimentos endocíticos parecem ser redistribuídos durante a divisão celular;
- A inibição da atividade de PI3-quinase sugere sua participação na endocitose de BSA, somando mais evidências de que esta molécula é adquirida através de endocitose de fase fluida.
  
- No presente estudo foi possível observarmos evidências de que o “shedding” ocorre também nas formas epimastigotas em presença de Igs não-específicas e Con-A.
- A análise do “shedding” em formas tripomastigotas na presença Igs específicas ou não-específicas mostrou que a liberação destas moléculas ocorre de maneira intensa, principalmente a 37°C nas duas populações testadas. Além disso, na presença de Igs não específicas apesar do grande número de vesículas observadas, em sua maioria não apresentaram marcação com ouro coloidal.
- A presença de FeCat é capaz de induzir a formação de “shedding” dos sítios aniônicos de tripomastigotas da cepa Y já a 4°C enquanto no clone CL-Brener, a liberação destes sítios só ocorre a 37°C.
- A presença de Con-A é capaz de induzir a formação de “shedding” em tripomastigotas da cepa Y a 37°C com maior frequência do que no clone CL-Brener.
- O “shedding” de Igs específicas ou não a partir da superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi* é inibido pela ação da fenantrolina, indicando o envolvimento de metaloproteases no processo.

## *Bibliografia*

---

AFFRANCHINO, J.L.; IBAÑEZ, C.F.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; REYES, M.B.; MACINA, R.A.; ASLUND, L.; PETTERSON, U. & FRASCH, A.C.C. **Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chaga's disease.** Mol. Biochem. Parasitol., 34, 221-228, 1989.

ALKARMI T.O., ALSHAKARCHI Z., BEHBEHANI K. ***Echinococcus multilocularis*: the non-specific binding of different species of immunoglobulins to alveolar hydatid cysts grown in vivo and in vitro.** Parasite Immunol., Jul,10(4), 443-57, 1988.

ANGELOPOULOS, E. **Pellicular microtubules in the family Trypanosomatidae.** J. Protozool., 17, 39-51, 1970.

ARAKI, N.; JONHSON, M.T. & SWANSON, J.A. **A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages.** J. Cell Biol., 135(5),1249-60, 1996.

ARAUJO, F.G. ; CHIARI, E. & DIAS, J.C.P. **Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chaga's Disease.** The Lancet, 31, 246-249, 1981.

BALBER, A.E. & STURTEVANT, J.E. **A surface glycoprotein of *Trypanosoma lewisi* binds immunoglobulin G from the serum of uninfected rats.** Infect. Immun., 53(2), 420-6, 1986.

BALBOA, M.A.; SÁEZ, Y. & BALSINDE, J. **Calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> is required for lysosome secretion in U937 promocytes.** J. Immunol., 170, 5276-5280, 2003.

BARRY, J.D. **Capping of variable antigen on *Trypanosoma brucei*, and its immunological and biological significance.** J. Cell Sci., 37,287-302, 1979.

BAZ A., CAROL H., MARCO M., CASABO L., JONES F., DUNNE D., NIETO A. **Fc-binding molecules specific for human IgG1 and IgG3 are present in *Echinococcus granulosus* protoscoleces.** Parasite Immunol., Sep, 20(9),399-404, 1998.

BERKEN, A. & BENACERRAF, B. **Properties of antibodies cytophilic for macrophages.** J. Exp. Med., 123 ,119-144, 1983.

BLOOM, B. R. **Games parasites play:how parasites evade immune surveillance.** Nature, 279(3), 21-26, 1979.

BOGUCKI, M.S. & SEED, J.R. **Parasite-bound heterospecific antibody in experimental African trypanosomiasis.** J. Reticuloendothel. Soc.,23(2), 89-101, 1978.

BRAKEBUSH, C. ; VARFOLOMEIEV, E.E. ; BATKIN, M. & WALLACH, D. **Structural requirements for inducible shedding of the p55 tumor necrosis factor receptot.** J. Biol. Chem., 29, 32488-32496, 1994.

BRENER, Z. & CHIARI, E. **Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 5(5), 220-224, 1963.

BRENER, Z. **Immune response and immunopatholgy in *Trypanosoma cruzi* infection.** In: *Chagas'Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on*

Transfusion and Clinical Medicine, 31-47. Edited by Wendel,S. , Brener,Z. , Camargo,M.E. , Rassi,A. , São Paulo, ISBT, Brazil, 1992.

BRENER, Z. **O parasito e sua interação com os hospedeiros.** In: *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*, 88-126. Edited by Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, , Brazil, 2000.

BRILEY, G.P. ; HISSONG, M.A. ; CHIU, M.L. & LEE, D.C. **The carboxyl-terminal valine residues of pro TGF  $\alpha$  are required for its efficient maturation and intracellular routing.** Mol. Biol. Cell, 8, 1619-1631, 1997.

BUTCHER, B.A.; SHOME, K.; ESTES, L.W.; CHOAY, J.; PETITOU, M.; SIE, P. & GLEW, R.H. ***Leishmania donovani*: cell-surface heparin receptors of promastigotes are recruited from an internal pool after trypsinization.** Exp. Parasitol.,71(1),49-59, 1990.

CAMARGO, E.P. **Phytomonas and other trypanosomatid parasites of plants and fruit.** Adv. Parasitol., 42, 29-112, 1999.

CAMUS, D. ; ZALIS, M. G. ; VANNIER-SANTOS, M. A. & BANIC, D. M. **The art of parasite survival.** Braz. J. Med. Microbiol. Res., 28,399-413, 1995.

CAMPETELLA, O. ; SANCHEZ, D. ; CAZZULO, J.J. & FRASCH, A.C.C. **A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens.** Parasitol. Today, 8 ,378-381, 1992.

CAMPOS-NETO, A. ; SUFFIA, I., CAVASSANI, K.A. ; SHYIAN, J. ; GREESON, K. ; OVENDALE, P. ; SILVA, J.S. ; REED, S.G. & SKEIKY, Y.A.W. **Cloning and characterization of a gene encoding an immunoglobulin-binding receptor on the cell surface of some members of the family *Trypanosomatidae*.** Infec. Immun., 71(9), 5065-76, 2003.

- CARPENTER, G. & COHEN, S. <sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor. **Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts.** J. Cell Biol., 71, 159-171, 1976.
- CASSARA, D. ; GINESTRA, A. ; DOLO, V. ; CARUSO, G. ; LUCANIA, G. & VITTORELLI, M.L. **Modulation of vesicle shedding in 8701 BC human breast carcinoma cells.** J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 30, 45-53, 1998.
- CASTRO, A.C.L.C. & RIBEIRO DOS SANTOS, R. **Imunopatologia do rim na forma crônica da moléstia de Chagas experimental.** Rev. Goiana Med., 23, 1-13, 1977.
- CHANG, C.S. & CHANG, K.P. **Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*.** Mol. Biochem. Parasitol., 16,267-276, 1985.
- CHERIAN, P.V. & DUSANIC, D.G. ***Trypanosoma lewisi*: immunoelectron microscopic studies on the surface antigens of bloodstream forms.** Exp. Parasitol., 43,128-142, 1977.
- CICARELLI, R.M.B. & DANIEL LOPES, J. **Characterization of a protein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes that cleaves non-immune IgG bound through its Fab fragment.** J. Immunol., 142,1685-1690, 1989.
- CLAGUE, M.J.; THORPE, C. & JONES, A.T. **Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of fluid phase endocytosis.** FEBS Lett., 367(3), 272-4, 1995.
- CLAYTON, C. , HÄUSLER,T. & BLATTNER,J. **Protein trafficking in Kinetoplastid protozoa.** Microbiol. Rev., Sept, 325-344, 1995.
- CONTRERAS V.T., ARAUJO-JORGE T.C., BONALDO M.C., THOMAZ N., BARBOSA H.S., MEIRELLES MDE N. & GOLDENBERG S. **Biological aspects**

**of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83(1), 123-33, 1988.

COOPENS, I.; OPPERDOES, F.R.; COURTOY, P.J. & BAUDHUIN, P. **Receptor mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*.** J. Protozool., 34, 465-473, 1987.

COOPENS, I.; BASTIN, P.; COURTOY, P.J.; BAUDHUIN, P. & OPPERDOES, F.R. **A rapid method purifies a glycoprotein of Mr 145,000 as the LDL receptor of *Trypanosoma brucei brucei*.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 178,185-191, 1991.

COOPENS, I.; BASTIN, P.; OPPERDOES, F.R.; BAUDHUIN, P. & COURTOY, P.J. ***Trypanosoma brucei brucei*: antigenic stability of its LDL receptor and immunological cross-reactivity with the LDL receptor of the mammalian host.** Exp. Parasitol., 74,77-86, 1992.

COOPENS, I.; BAUDHUIN, P.; OPPERDOES, F.R. & COURTOY, P.J. **Receptors for the host low density lipoproteins on hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,6753-6757, 1988.

COOPENS, I.; BAUDHUIN, P.; OPPERDOES, F.R. & COURTOY, P.J. **Role of acidic compartments in *Trypanosoma brucei*, with special reference to low-density lipoprotein processing.** Mol. Biochem. Parasitol., 58,223-232, 1993.

CRAIG, P.S. **Surface-associated proteins and host IgG on early and late metacystode stages of *Taenia pisiformis*.** Parasite Immunol., 10(3),243-54, 1988.

- CUNA, C.R. , KIERSZENBAUM, F. & WIRTH, J.J. **Binding of the specific ligand to Fc receptors on *Trypanosoma cruzi* increases the infective capacity of the parasite.** Immunol., 72,114-120, 1991.
- CUNHA E SILVA, N.; SANT'ANNA, C.; PEREIRA, M.G.; PORTO-CARREIRO, I.; JEOVANO, A.L. & DE SOUZA, W. **Reservosomes: multipurpose organelles?** Parasitol. Res., 99(4), 325-7, 2006.
- CURRIE, G. **Immunological aspects of host resistance to the development and growth of cancer.** Biochem. Biophys. Acta, 458,135-165, 1976.
- CURRIE, G. & ALEXANDER, P. **Spontaneous shedding of TSTA by sarcoma cells: its possible role in facilitating metastatic spread.** Br. J. Cancer, 29,72-75, 1974.
- DÄERON, M. **Fc receptor biology.** Annu. Rev. Immunol., 15 ,203-234, 1997.
- DAINIAK, N. **Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation, and growth.** Blood, 78(2), 264-276, 1991.
- DE TITTO, E.H. & ARAUJO, F.G. **Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chaga's disease.** Clin. Immunol. Immunophatol., 46,157-161, 1988.
- DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Int. Rev. Cytol., 86,197-282, 1984.
- DE SOUZA, W.; CARVALHO, T.U. & BENCHIMOL, M. ***Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake.** Exp. Parasitol., 45,101-105, 1978a.



- DE SOUZA, W.; MARTINEZ-PALOMO, A. & GONZALES-ROBBLES, A. **The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: cytochemistry and freeze fracture.** J. Cell Sci., 33, 285-299, 1978b.
- DE SOUZA, W. **Estrategias parasitarias de los protozoos intracelulares.** Invest. Y Ciencia, 212,56-63, 1994.
- DE SOUZA, W. **O parasito e sua interação com os hospedeiros.** In: *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas, 75-86. Edited by Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- DE SOUZA, W. **O parasito e sua interação com o hospedeiro.** In: Brener Z, Andrade, Z A & Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. 2ª Edição, Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, p.88-126, 2000.
- DE SOUZA, W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Curr. Pharm. Des., 8(4),269-283, 2002.
- DIFFLEY, P. **Comparative immunological analysis of host plasma proteins bound to bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* subspecies.** Infect. Immun.,21(2),605-12, 1978.
- DIFFLEY, P. & HONIGBERG, B. M. **Immunologic analysis of host plasma proteins on bloodstream forms of African pathogenic trypanosomes. II. Identification and quantitation of surface-bound albumin, nonspecific IgG, and complement on *Trypanosome congolense*.** J. Parasitol., 63, 599-606, 1978.
- DO CAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P. & MORENO, S.N.J. **Acidocalcisomes- conserved from bacteria to man.** Nature Rev., 3,251-264, 2005.

- DOLO, V. ; GINESTRA, A. ; GHERSI, G. ; NAGASE, H. & VITORELLI, M.L.  
**Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities.** J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 26, 173-180, 1994.
- DOMBROWICZ, D.; FLAMAND, V.; BRIGMAN, K.K.; KOLLER, B.H. & KINET, J.P. **Abolition of anaphylaxis by target disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor  $\alpha$  chain.** Cell, 75,969:976, 1993.
- DOYLE, J.J. ; BEHIN, R. ; MANUEL, J. & ROWE, D.S.J. **Antibody-induced movement of membrane components of *Leishmania enriettii*.** J. Exp. Med., 139(5),1061-9, 1974.
- DOWNING, J.R. ; ROUSSEL, M.F. & SHERR, C.J. **Ligand and protein kinase-C down-modulate the colony-stimulating factor-1 receptor by independent mechanisms.** Mol. Cell Biol., 9, 2890-2896, 1989.
- DWYER, D.M. **Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens.** J. Immunol., 117, 2081-2091, 1976.
- EHLERS, M.R. ; SCHWAGER, S.L. ; SCHOLLE, R.R. ; MANJI, G.A. ; BRANDT, W.F. & RIORDAN, J.F. **Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence.** Biochemistry, 35, 9549-9559, 1996.
- ENGLUND, P.T. **The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors.** Annu. Rev. Biochem., 62,121-38, 1993.
- ENRIQUEZ, F.J.; BOGGAVARAPU, J. & BRADLEY-DUNLOP D. **Presence of non-Fab IgE binding molecules in the intestinal nematode parasite of mice**

*Heligmosomoides polygyrus*. Int. Arch. Allergy Immunol. , 99 (1), 123-6, 1992.

FREVERT, U. ; SCHENKMAN, S. & NUSSENZWEIG, V. **Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi***. Infection and Immunity, 60, 2349-2360, 1992.

GALBRAITH, R.A. & McELRATH, M.J. **Heme binding to *Leishmania mexicana amazonensis***. Mol. Biochem. Parasitol., 29,47-54, 1988.

GIANNINI, M.S. & D'ALESSANDRO, P.A. **Unusual antibody-induced modulation of surface antigens in the cell coat of a bloodstream trypanosome**. Science, 201(4359),916-918, 1978.

GOLÇALVES, M.F. ; UMEZAWA, E.S. ; KATZIN, A.M. ; DE SOUZA, W. ; ALVES, M.J.M. ; ZINGALES, B. & COLLI, W. ***Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles**. Exp. Parasitol., 72,43-53, 1991.

HAGIWARA, Y. & OZAWA, E. **Suppression of transferrin internalisation in myogenic L6 cells by dibucaine**. Biochim. Biophys. Acta, 1051,237-241, 1990.

HEANEY, M.L. & GOLDE, D.W. **Soluble cytokine receptors**. Blood, 87, 847-857, 1996.

HOARE, C.A & WALLACE, F.G. **Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology**. Nature, 212, 1385-1386, 1966.

HOFT, D. F.; FARRAR, P. L.; KRATZ-OWENS, K. & SHAFFER, D. **Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses**. Infect. Immun., 64,3800-3810, 1996.

- JOINTER, K.A.; DIAS DA SILVA, W.; RIMOLDI, M.T.; HAMMER, C.H.; SHER, A. & KIPNIS, T.L. **Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases.** J. Biol. Chem., 263,11327-11335, 1988.
- KALLINA B. & MCMANUS D.P. **An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin.** Parasitology, Apr;106 ( Pt 3),289-96, 1993.
- KLOETZEL, J. & DEANE, M. P. **Presence of immunoglobulins on the surface of bloodstream *Trypanosoma cruzi*. Capping during differentiation in culture.** Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 19, 397-402, 1977.
- KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R.S. **Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis.** Clin. Exp. Immunol., 37,416-423, 1979.
- LANGRETH, S.G. & BALBER, A.E. **Protein uptake and digestion in blood stream and culture forms of *Trypanosoma brucei*.** J. Protozool., 22,40-53, 1975.
- LIMA, M.F. & VILLALTA, F. ***Trypanosoma cruzi* receptors for human transferrin and their hole.** Mol. Biochem. Parasitol., 38,245-252, 1990.
- LOUKAS, A.; JONES, M.K.; KING, L.T.; BRINDLEY P.J. & MCMANUS D.P. **Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes.** Infect. Immun., Jun;69(6),3646-51, 2001.
- MARTINEZ-PALOMO, A.; DE SOUZA, W. & GONZALES-ROBBLES, A. **Topographical differences in the distribution of surface coat components and**

- intarmembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*.** J. Cell Biol., 69,507-513, 1976.
- MELLMAN, I. **Endocytosis and molecular sorting.** Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 12,575-625, 1996.
- MIRANDA-SANTOS, I.K.F. & CAMPOS-NETO, A. **Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae.** J. Exp. Med., 154,1732-1742, 1981.
- MIRANDA-SANTOS, I.K.F. & CAMPOS-NETO, A. **Immune evasion by *Trypanosomatidae*: normal aggregated immunoglobulin protects against lysis by alternative complement pathway.** Braz. J. Med. Biol. Res., 28,585-589, 1995.
- MOESTRUP, S.K. **The alpha 2-macroglobulin receptor and epithelial glycoprotein-330: two giant receptors mediating endocytosis of multiple ligands.** Biochim. Biophys. Acta,1197(2),197-213, 1994.
- MUKHERJEE, S.; GHOSH, R.N. & MAXFIELD, F.R. **Endocytosis.** Physiol. Rev., 77(3),759-803, 1997.
- NAGASHUNMUGAM, T.; LUBINSKI, J.; WANG, L.; GOLDSTEIN, L.T.; WEEKS, B.S.; SUNDARESAN, P. KANG, E.H.; DUBIN, G. & FRIEDMAN, H.M. **In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor.** J. Virol., Jul;72(7),5351-9, 1998.
- NICOLSON, G.L. **Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components.** Biochim. Biophys. Acta, 457,57-108, 1976.

- OVERATH, P. & ENGSTLER, M. **Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system.** Mol. Microbiol., 53(3), 735-44, 2004.
- PAULIN, J.P. **The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy.** J. Cell Biol., 66, 404-413, 1975.
- PESCHON, J.J. ; SLACK, J.L. ; REDDY, P. ; STOCKING, K.L. ; SUNNARBORG, S.W. ; LEE, D.C. ; RUSSEL, W.E. ; CASTNER, B.J. ; JOHNSON, R.S. ; FITZNER, J.N. ; BOYCE, R.W. ; NELSON, N. ; KOZLOSKY, C.J. ; WOLFSON, M.F. ; RAUCH, C.T. ; CERRETI, D.P. ; PAXTON, R.J. ; MARCH, C.J. & BLACK, R.A. **An essential role for ectodomain shedding in mammalian development.** Science, 282, 1281-1284, 1998.
- PETERS, W. & GILLES, H.M. **In: A colour atlas of tropical medicine and parasitology,** p48. 3<sup>rd</sup> Ed. Edited by Wolfe Medical Publications Ltda, 1991.
- PIMENTA, P.F.P. ; DE SOUZA, W. ; SOUTO-PADRÓN, T. & DA SILVA, P.P. **The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: a fracture-flip, replica-staining label-fracture survey.** Eur. J. Cell Biol., 50, 263-271, 1989.
- PIMENTA, P.F.P.; PINTO DA SILVA, P.; RANGARAJAN, D.; SMITH, D.F. & SACKS, D.L. ***Leishmania major*: association of the differentially expressed gene B protein and the surface lipophosphoglycan as revealed by membrane capping.** Exp. Parasitol., 79, 468-479, 1994.
- PINTO DA SILVA, P.; MARTINEZ-PALOMO, A. & GONZALEZ-ROBLES, A. **Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface, cap formation and microexudate.** J. Cell Biol., 64, 538-550, 1975.

PLEASS, R.J. & WOFF, J.M. **Fc receptors and immunity to parasites.** Trends in Parasitol., 17(11),545-551, 2001.

PLEASS, R.J.; ARESCHOUG, T.; LINDAHL, G. & WOOF, J.M. **Streptococcal IgA-binding proteins bind in the Calpha 2-Calpha 3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89.** J. Biol. Chem., Mar 16, 276(11), 8197-204,2001.

PORTO-CARREIRO, I. ; ATTIAS, M. ; MIRANDA, K. ; DE SOUZA,W. & CUNHA E SILVA, N. ***Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes.** Eur. J. Cell Biol., 79(11),858-869, 2000.

PRESTON, T.M.; O'DELL, D.S. & KING, C.A. **Fluorescence microscope observations of some surface components of the amoeboflagellate *Naegleria gruberi* during amoeboid locomotion.** Cytobios., 13,207-216, 1975.

RALTON, J.E.; MILNE, K.G.; GUTHER, M.L.; FIELD, R.A. & FERGUSON, M.A. **The mechanism of inhibition of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in *Trypanosoma brucei* by mannosamine.** J. Biol. Chem.,268(32),24183-9, 1993.

RAVETCH, J.V. & KINET, J.P. **Fc receptors.** Annu. Rev. Immunol., 9,457-492, 1991.

REY, L. **Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi*: A Doença.** In: Parasitologia, cap. 12, p. 153. Ed.3, Edited by Guanabara Koogan – RJ, 2001.

RIMOLDI, M.T. ; SHER, A. ; HIENY, S. ; LITUCHI, A. ; HAMMER, C.H. & JOINER, K. **Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of molecules**

**that accelerate the decay of complement C3 convertases.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,193-197, 1988.

SAITO, A.; PIETROMONACO, S.; LOO, A.K-C. & FARQUHAR, M.G. **Complete cloning and sequencing of rat gp330/megalin, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91,9725-9729, 1994.

SALMON, D. ; GEUSKENS, M. ; HANOCQ, F. ; HANOCQ-QUERTIER, J. ; NOLAN, D. ; RUBEN, L. ; & PAYS, E. **A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG expression site-associated genes in *T. brucei*.** Cell, 78,75-86, 1994.

SANT'ANNA, C.; DE SOUZA, W. & CUNHA-E-SILVA, N. **Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*.** Microscop. Microanal., 10, 637-646, 2004.

SARAIVA, E.M.; VANNIER-SANTOS, M.A.; SILVA-FILHO, F.C. & DE SOUZA, W. **Anionic site behavior in *Leishmania* and its role in the parasite-macrophage interaction.** J. Cell Sci.,93,481-9, 1989.

SASSE, R. & GULL, K. **Tubulin post-translational modifications and the construction of microtubular organelles in *Trypanosoma brucei*.** J. Cell Sci., 90, 577-589, 1998.

SBARBA, P.D. & ROVIDA, E. **Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding.** Biol. Chem., 383,69-83, 2002.

SCHELL, D. ; EVERS, H. ; LOTTSPREICH, F. ; CORNELISSEN, A. & OVERRATH, P. **A transferrin-binding protein of *Trypanosoma brucei* is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site.** The EMBO J., 10 (5),1061-1066, 1991.



- SCHMUÑIS, G.A. ; SZARFMAN, A ; LANGEMBACH, T. & DE SOUZA, W. **Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* antibodies.** Infect. Immun., 20,567-569, 1978.
- SCHMUÑIS, G.A. ; SZARFMAN, A. ; DE SOUZA, W. & LANGEMBACH, T. ***Trypanosoma cruzi*: antibody-induced mobility of surface antigens.** Exp. Parasitol., 50,90-102, 1980.
- SCHWAGER, S.L. ; CHUBB, A.J. ; SCHOLLE, R.R. ; BRANDT, W.F. ; ECKERSKORN, C. ; STURROCK, E.D. & EHLERS, M.R. **Phorbol ester-induced juxtamembrane cleavage of angiotensin-converting enzyme is not inhibited by a stalk containing intrachain disulfides.** Biochem., 37 (44),15449-56, 1998.
- SHERWIN, T. & GULL, K. **Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes.** Cell, 57(2),211-221, 1989.
- SHPETNER, H.; JOLY, M.; HARTLEY, D. & CORVERA, S. **Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic pathway revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin.** J. Cell Biol.,132(4),595-605, 1996.
- SHEPHERD, P.R.; SOOS, M.A. & KENNETH, S. **Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase block exocytosis but not endocytosis of transferring receptors in 3T3-L1 adipocytes.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 211(2),535-539, 1995.
- SILVA, L.H.P. & NUSSSENSWEIG, V. **Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco.** Fol. Clin. Biol., 20,191-207, 1953.

- SLEIN, M.W. & LOGAN, G.F. Jr. **Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus***. J. Bacteriol., 85,369-81, 1963.
- SOARES, M.J. & DE SOUZA, W. **Cytoplasmic organelles of Trypanosomatids: a cytochemical and steriological study**. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 20(2), 349-361, 1988.
- SOARES, M.J. & DE SOUZA, W. **Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi***. Parasitol. Res., 77,461-468, 1991.
- SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T. & DE SOUZA, W. **Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi***. J. Cell Sci., 102,157-167, 1992.
- SOUTO-PADRÓN, T. ; DE SOUZA, W. & HEUSER, J.E. **Quick-freeze, deep-etch rotatory replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herptomonas megaseliae***. J. Cell Sci., 69,167-178, 1984.
- SOUTO-PADRÓN, T.; CUNHA E SILVA, N. L. & DE SOUZA, W. **Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 88(4),517-528, 1993.
- SOUTO-PADRÓN, T.; LIMA, A.P. & RIBEIRO, R.O. **Effects of dibucaine on the endocytic/exocytic pathways in *Trypanosoma cruzi***. Parasitol. Res., 99,317-320, 2006.
- STEVERDING, D. ; STIERHOF, Y. ; CHAUDHRI, M. ; LIGTENBERG, M. ; SCAHLL, D. ; BECK-SICKINGER, A.G. & OVERATH, P. **ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferring binding protein complex**. J. Cell Biol., 64,78-87, 1994.

- SZARFMAN, A.; QUEIROZ, T. & DE SOUZA, W. **Mobility of concanavalin A receptors in *Trypanosoma cruzi***. J. Parasitol., 66,1055-1057, 1980.
- TAMBOURGI, D.V. ; KIPNIS, T.L. ; DIAS DA SILVA, W. ; HEATH, S. ; HALL, B.F. ; SHER, A. ; JOINER, K. & OGDEN, G.B. **A partial cDNA clone of T-DAF, a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF**. Infect. Immun., 61,3656-3663, 1993.
- TAKAI, T.; LI, M; SYLVESTRE, D.; CLYNES, R. & RAVETCH, J.V. **FcR  $\gamma$  chain deletion results in pleiotropic effector cell defects**. Cell, 76,519-529, 1994.
- TAYLOR, D.D. & BLACK, P.H. **Shedding of plasma membrane fragments. Neoplastic and developmental importance**. Dev. Biol.,3,33-57, 1986.
- VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; EL BOUHDIDI, A.; VAN BEECK, K.; CARLIER, Y.; DUBREMETZ, J.F. & VERSCHUEREN, H. **Opcionization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture**. Parasite Immunol.,Nov;21(11),555-63, 1999.
- VINCENDEAU, P. & DAERON, M. ***Trypanosoma musculi* co-express several receptors binding rodent IgM, IgE, and IgG subclasses**. J. Immunol., Mar 1,142(5),1702-9, 1989.
- VOYIATZAKI, C.S. & SOTERIADOU, K.P. **Evidence of transferrin binding sites on the surface of *Leishmania* promastigotes**. J. Biol. Chem., 265(6),22380-22385, 1990.

VOYIATZAKI, C.S. & SOTERIADOU, K.P. **Identification and isolation of the *Leishmania* transferrin receptor.** J. Biol. Chem.,267(13),9112-7, 1992.

WEBSTER, P. **Endocytosis in African Trypanosomes. I. Three-dimensional structure of endocytic organelles in *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*.** Eur. J. Cell Biol., 49,295-302, 1989.

WEBSTER, P. & FISH, W.R. **Endocytosis by African Trypanosomes. II. Occurrence in different life-cycle stages and intracellular sorting.** Eur. J. Cell Biol., 49,303-310, 1989.

WEBSTER, P. & GRAB, D. **Intracellular colocalization of variant surface glycoprotein and transferring-gold in *Trypanosoma brucei*.** J. Cell Biol., 106,279-288, 1988.

WEBSTER, P. & RUSSEL, D.G. **The flagellar pocket of trypanosomatids.** Parasitol. Today, 9,201-206, 1993.

WHITE, A.C. JR.; ROBINSON, P. & KUHN, R. ***Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response.** Chem. Immunol.,66,209-30, 1997.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **WHO definition of Chagas' disease (American trypanosomiasis).** Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>, 2002.

YOUNÉS-CHENNOUFI, A.B. ; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. ; TRICOTTET, V. ; EISEN, H. ; REYNES, M. & SAID, G. **Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice.** Trans. Royal Trop. Med. Hyg., 82, 77-83, 1988.

YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U. ; PRAL, E.M.F. ; OLIVEIRA JR, C. ; ALFIERI, S.C. & STOLF, A.M.S. ***Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigotes forms.** Acta Tropica, 57, 307-315, 1994.

ZINGALES,B.; RONDINELLI,E.; DEGRAVE,W.; SILVEIRA,J.F.; LEVIN,M.; LE PASLIER,D.; MODABBER,F.; DOBROKHOTOV,B.; SWINDLE,J.; KELLY,J.M.; ASLUND,L.; HOHEISEL,J.D.; RUIZ,A.M.; CAZZULO,J.J.; PETERSON,U. & FRASCH,A.C. **The *Trypanosoma cruzi* genome initiative.** Parasitol. Today, 13(1),16-22, 1997.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)