

Juliana da Matta Furniel Dutra

“*TRYPANOSOMA CRUZI* E O PROCESSO DE INVASÃO
NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS: PARTICIPAÇÃO DE
PROTEÍNAS FOSFORILADAS E MICRODOMÍNIOS DE
MEMBRANA”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dutra, Juliana da Matta Furniel

TRYPANOSOMA CRUZI E O PROCESSO DE INVASÃO NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS:
PARTICIPAÇÃO DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS E MICRODOMÍNIOS DE MEMBRANA.
Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF, 2006.

VI, 148f.: il

Referências Bibliográficas: f . 119

Orientadores: Tecia Maria Ulisses de Carvalho

Wanderley de Souza

Tese de doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2006.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Citoesqueleto 3. Fosforilação 4. Lipídeos 5. Biologia Celular

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Universidade Federal do Rio de Janeiro), sob a orientação da Dra Tecia Maria Ulisses de Carvalho e do Dr Wanderley de Souza e com apoio financeiro dos seguintes órgãos: CAPES, CNPq e Faperj.

Aos meus pais Hélio e Angela. Por todo amor, apoio e confiança.

Essa conquista é para vocês.

Ao Carlos, por toda paciência, companheirismo, dedicação e amor.

Você é o meu melhor resultado!

Agradecimentos

Ao Prof. Wanderley de Souza, grande incentivador da ciência, um profissional como nunca vi e por quem tenho uma enorme admiração. Muito obrigada pela chance de aprender ciência na sua equipe e de chegar até aqui;

À Prof. Tecia, por esses 10 anos de aprendizagem e convivência, por todos os momentos bons e ruins, por acreditar no meu potencial e me conduzir até aqui;

À Prof. Narcisa, por me “adotar” tantas vezes durante esses 10 anos, pela sua grande paciência e por ser a maior responsável pela minha paixão por biologia celular. Nunca esquecerei dos seus “flip-flops”!!!! Muito Obrigada.

À Prof. Márcia, dona de um enorme bom-humor e capaz de me fazer aprender microscopia eletrônica!!! Obrigada pelas dicas valiosas e pela disponibilidade sempre que precisei!!!

À Prof. Rossiane, uma grande ouvinte dos meus chorosos lamentos, dona de um coração enorme e apaziguador. Foi maravilhoso contar com você durante esses 10 anos!

À Prof. Maria Cristina, por me ensinar a ser apaixonada por cridídias e por me abrir uma porta para que eu seguisse meu caminho após o doutorado. Espero poder sempre discutir ciência com você!!!

Aos meus grandes companheiros de grupo: ao Gustavo, com toda sua paciência e boa vontade para me ajudar; ao Bruno, meu grande confidente, capaz de me fazer rir diante da maior decepção e me ensinar que tomar um pé no traseiro só serve para nos empurrar pra frente; aos “Thiagos”, sempre dispostos a me ajudar em experimentos no final do dia; ao Julio, por me mostrar que os fortões também são românticos, e a minha “boneca Emile”, uma amiga sem igual, cheia de personalidade, que nunca me deixou sozinha durante os últimos quatro anos. Você é muito especial para mim!!!

A um super-amigo, o inacreditável, Celso Sant’Anna . O que dizer de você? Alguém com tantas qualidades se torna tão especial que faltam as palavras. Você é mais que um amigo, você me mostrou que tudo pode ser melhorado e que nada pode nos abalar quando acreditamos naquilo que fazemos. Obrigada por tudo. Até o altar, padrinho!!!!

As super- maluquetes, Daniela e Letícia, maravilhosas companhias em todos os momentos. Inteligentes e muito dedicadas, tenho certeza que vocês vão longe. Vocês tornaram minha vida mais bem-humorada e cheia de gargalhadas. Obrigada!

À eterna mãe do ano, Loraine, uma amiga de tanto tempo e de tantas estórias. Quero ser como você quando crescer!!!

A Marina e Ana Claudia, grandes companheiras de almoço e da vida toda. Vocês fazem muita falta por aqui!!!!

Ao Sergio Seabra, figura extraordinária, sempre disposto a dar idéias e um grande colaborador desse trabalho. Você merece muitos prêmios “Nobel”!!!! Obrigada do fundo do coração!

À Daniele Cavalcanti, uma grande amiga e responsável por meu “desencalhe” há alguns anos atrás!!!!

Aos amigos Joana e Leandro, obrigada pela maravilhosa amizade durante todo esse tempo! Adoro vocês!

A todos os amigos do Laboratório, obrigada por tornarem meus dias aqui mais felizes. Sei que vocês são grandes amigos e não sei como seria sem a ajuda de vocês!!! Obrigada por tudo!

A Noêmia e Eliandro, anjos na microscopia eletrônica e que me salvaram tantas vezes! Obrigada!

A três pessoas grandiosas: Bosco, Nete e Cazuza. Vocês tornaram esse trabalho possível e são responsáveis por essa conquista. Obrigada por me darem tanto suporte durante esses anos.

A minha querida amiga Mariane, companheira de tantas noitadas em Caxambu e de tantas conversas sobre sinalização celular. Você é uma amiga do peito!!!!

As minhas amigas da Biologia, Ana Paula, Maria Clara, Patrícia e, principalmente, Priscila. Vocês moram no meu coração, sempre!!!!

As minhas irmãs, Tatiana e Joana, as melhores companheiras que eu podia ter e ao meu pequeno anjo Gabriel, motivo de tanto orgulho e que vejo crescer mais a cada dia. Amo vocês!

A toda minha família, aqueles que estão perto e aos que morro de saudade, vocês mantiveram sempre acesa minha vontade de continuar em frente!!!!

A família do Carlos, em breve minha família também, por todo carinho com que me receberam nos últimos anos.

Ao meu maior incentivador, meu avô Hélio, que Deus levou faltando tão pouco para que eu chegasse até aqui. Seja como for, faça com amor.

À Deus, pela maravilha que é viver.

RESUMO

“*Trypanosoma cruzi* e o processo de invasão nas células hospedeiras: participação de proteínas fosforiladas e microdomínios de membrana.”

Juliana da Matta Furniel Dutra

Orientadores: Dra Tecia Maria Ulisses de Carvalho

Dr Wanderley de Souza

Resumo de tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Formas tripomastigotas, estágio infectante do *Trypanosoma cruzi*, são incapazes de se dividirem e infectam vários tipos celulares, como macrófago, considerado o primeiro sítio de invasão. Trabalhos anteriores haviam demonstrado que a fosforilação em tirosina é um pré-requisito para invasão de tripomastigotas em células fagocíticas como macrófago (Vieira; Carvalho; De Souza, 1994) e que esses eventos de fosforilação colocalizavam com uma concentração de actina no sítio de entrada do parasito. Como sugerido por Vieira *et al* (2002) pelo menos seis peptídeos tem seus níveis de fosforilação em tirosina aumentados quando macrófagos são infectados com tripomastigotas, entre eles a paxilina, uma proteína citoplasmática de 68 kDa que se localiza em pontos chamados de adesão focal (Turner *et al*, 1990). Além de proteínas fosforiladas como a paxilina, plataformas de membrana também estão envolvidos nesse processo. Plataformas de membrana são pequenas regiões (100-200nm) heterogêneas, altamente dinâmicas, com domínios enriquecidos em esteróis e esfingolípídeos que concentram processos celulares (Simons e Ikonen, 1997). Nossos resultados mostram que a expressão de paxilina assim como a sua fosforilação em resíduos de tirosina é importante para a invasão e sobrevivência de tripomastigotas de *T.cruzi* no interior de macrófagos, LLC-MK2 e fibroblastos T-17, cujo fenótipo é knock-out para paxilina. Além da necessidade de proteínas fosforiladas para modular o processo de invasão, demonstramos que a presença de plataformas de membrana intactos na superfície das células hospedeiras também é um pré-requisito para o sucesso da infecção, uma vez que células depletadas de colesterol pela ação da metil beta ciclodextrina mostraram uma redução nos índices de internalização e sobrevivência, sendo responsável pelo disparo de apoptose em células infectadas com tripomastigotas de *T.cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, actina, fosforilação, biologia celular.

ABSTRACT

“*Trypanosoma cruzi* and the process of invasion into host cells: role of phosphorylated proteins and membrane-rafts”.

Juliana da Matta Furniel Dutra

Orientadores: Dra Tecia Maria Ulisses de Carvalho

Dr Wanderley de Souza

Resumo de tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Trypomastigote forms, the infective stage of *T.cruzi*, are unable to divide and can invade a large number of cells like macrophages, probably the first site of infection in humans. Previous studies have shown that tyrosine phosphorylation is required for trypomastigotes invasion into macrophages (Vieira et al, 1994). This event is due with F-actin concentration around parasite invasion site. Viera *et al*, 2002 suggested that six proteins or peptides have their levels of tyrosine phosphorylation increased when macrophages are infected with trypomastigotes and their molecular weights match with the ones for paxillin. Paxillin is a 68-kDa cytoplasmic adaptor protein involved in actin modulation and its function is correlated with tyrosine phosphorylation (Turner et al, 1990). Besides phosphorylated proteins acting in the invasion process, membrane-rafts seems to be involved into this process also. Membrane-rafts are small regions (100-200nm), heterogeneous, highly dynamic, with domains enriched by sterols and sphingolipids that are responsible for some cell process like phagocytosis of virus, bacteria and even protozoans (Simons & Ikonen, 1997). Our results shows that paxillin expression and its tyrosine phosphorylation is important to *T.cruzi* invasion and survival inside macrophages, LLC-MK2 cells and T-17 fibroblasts, which has one phenotype paxillin knock-out. Besides phosphorylated proteins acting into the invasion process, we have demonstrated that intact membrane-rafts are necessary for a successful infection, since depletion of cholesterol from host cells and

Lista de Abreviaturas e Siglas

24S α rDNA – Subunidade 24 alfa do ácido desoxirribonucléico ribossomal
ACTH - Hormônio corticotrófico
AMP – Adenosina monofosfato
Arp2/3 - Complexo proteico regulador de filamentos de actina
BrdUTP – Bromouridina
Ca²⁺ - Cálcio
CaCl₂ – Cloreto de cálcio
c-DNA – DNA complementar
CHO – Célula de ovário de hamster chinês
cm³ – Centímetro cúbico
CO₂ – Gás carbônico
CSF-1 – Fator estimulador de colônias-1
CTB – Toxina do cólera subunidade B
Cy5-DMPE – 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfatidiletanolamina
DHE - deidroergosterol
DPPE - 1,2-Bis(diphenylphosphinoethane – isso tá em ingles, troca para ph por F e y por i.
DRM – Fração de membrana resistente a detergente
EGF – Fator de crescimento epidérmico
F-actina – Actina filamentosa
FAK – Quinase de adesão focal
FimH – Lectina
G418 - Geneticina
GFP – Proteína Fluorescente Verde
GM1 – Gangliosídeo 1
GM3 – Gangliosídeo 3
GPI – Glicofosfatidilinositol
HeLa - célula de carcinoma cervical
Hic-5 – Clone 5 induzido por peróxido de hidrogênio
IGF-1 – Fator de crescimento tipo insulina-1
IL1 – Interleucina 1
J774 – Macrófago de linhagem (ATCC)
kDa – Kilodalton (unidade de massa molecular de proteínas)
LAMP – Proteína de membrana associada a lisossomo
l_d – Fase de desordem líquida
l_o – Fase semi-sólida
log – logaritmo
LPA – Ácido lisofosfatídico
LPG – Lipofosfoglicano
M – Molar
MBCD – Metil β ciclodextrina
MHC – Complexo de histocompatibilidade
mL – mililitro (10⁻³ litro)
mm – Milímetro (10⁻³ metro)
mM – milimolar (10⁻³ molar)
N – Normal

NAPI-22 – Proteína neuronal
NBD - Nitro-benoxadiazol
NGF- fator de crescimento neuronal
nm – nanômetro (10^{-9} metro)
p110 – Subunidade catalítica da Fosfatidil-inositol 3 quinase
p85 – Subunidade regulatória da Fosfatidil-inositol 3 quinase
PBS – Solução salina tamponada
PEG - Polietilenoglicol
pH – Potencial de hidrogênio
PI3K – Fosfatidil-inositol 3 quinase
PKA – Tirosina fosfatase A
PP2A – Serino/treonina fosfatase 2
PYK2 – Fosfoquinase de adesão focal 2
RNAi – Interferência de RNA
RPM – Rotações por minuto
rRNA – Ácido ribonucléico ribossomal
SCF- fator de células tronco
SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida
SH₂ – domínio de homologia 2
Syk- tirosina quinase citoplasmática
T-17 -/- - Fibroblasto que não expressa paxilina
T-17 CPax – Fibroblasto com paxilina de embrião de galinha re-introduzido
Tc85 – Glicoproteína de 85 kilodaltons de *Trypanosoma cruzi*
Tc-Tox – Toxina tipo porina de *Trypanosoma cruzi*
TF – Temperatura de fusão
TGF- β – Fator de crescimento tumoral β
TNF α - Fator de necrose tumoral α
TS – *Trans*-sialidase
Vero – células de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*)
WASP – Proteína associada a síndrome de Wiskott-Aldrich
WHO – Organização Mundial de Saúde
 μ g – micrograma (10^{-6} grama)
 μ m – Micrômetro (10^{-6} metro)
 μ M – micromolar (10^{-6} molar)

Índice

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. O parasita e a Doença de Chagas | 1 |
| 1.2. Classificação taxonômica | 2 |
| 1.3. Formas evolutivas e o ciclo biológico | 3 |
| 1.4. A interação <i>Trypanosoma cruzi</i> – célula hospedeira e o ciclo intracelular | 8 |
| 1.5. O vacúolo parasitóforo e o escape para o citoplasma | 17 |
| 1.6. O citoesqueleto e a sinalização disparada no momento da invasão – participação da paxilina ... | 19 |
| 1.7. Fosforilação da paxilina | 22 |
| 1.8. Outros mecanismos de invasão – participação de domínios de membrana | 26 |
| 1.9. Marcadores de plataformas de membrana | 28 |
| 1.10. Plataformas de membrana, o colesterol e a dinâmica do citoesqueleto | 30 |
| 1.11. Participação de plataformas de membrana na entrada de patógenos | 34 |
| 1.12. Alterações no colesterol de membranas – Efeito na interação parasito-célula hospedeira | 35 |
| 1.13. Flotinininas e caveolinas – Proteínas de plataformas de membrana | 37 |
| 2. OBJETIVOS | 42 |
| 3. MATERIAS & MÉTODOS | 43 |
| 3.1. Parasitas | 43 |
| 3.2. Cultura de células normais e parasitadas | 43 |
| 3.3. Microscopia Óptica | 45 |
| 3.4. Microscopia Óptica de Fluorescência | 48 |
| 3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura | 50 |
| 3.6. Detecção das células em apoptose pela técnica de TUNEL | 50 |
| 3.7. Observação da exposição de fosfatidilserina por citometria de fluxo | 51 |
| 3.8. Western Blotting | 52 |
| 4. RESULTADOS | 53 |
| 4.1. Determinação dos índices de adesão, internalização e infecção de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em vários tipos celulares | 53 |
| 4.2. Determinação da capacidade de sobrevivência de tripomastigotas no interior de macrófagos, células LLC-MK ₂ e fibroblastos T-17 | 54 |

| | |
|--|----|
| 4.3. Localização da paxilina - relação entre eventos de fosforilação e concentração de actina durante a invasão do <i>T.cruzi</i> | 57 |
| 4.4. Detecção da paxilina por Western Blotting..... | 68 |
| 4.5. Efeito do tratamento com metil β - ciclodextrina nos índices de adesão e internalização de epimastigotas e tripomastigotas de <i>T.cruzi</i> | 78 |
| 4.6. Determinação do índice de sobrevivência do <i>T.cruzi</i> em células pré-tratadas com metil β - ciclodextrina | 82 |
| 4.7. O efeito do tratamento com filipina sobre os índices de adesão e internalização de células infectadas com <i>T.cruzi</i> | 86 |
| 4.8. Localização de plataformas de | |

1. Introdução

1.1. O parasita e a Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida. Esse protozoário foi descrito pela primeira vez por Carlos Justiniano Chagas, no início do século passado (Chagas, 1909) e caracteriza-se pela presença de um flagelo e de uma mitocôndria única e ramificada onde está situado o cinetoplasto, estrutura formada a partir da condensação do DNA mitocondrial. Este parasita é capaz de infectar mais de 150 espécies de 24 famílias de animais domésticos e selvagens, incluindo o homem. Segundo os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas está presente em cerca de 18 países do continente americano, dividido em duas áreas: o Cone Sul, região onde o vetor reside dentro das habitações ou nas áreas ao seu redor; e a América Central e México, região onde o vetor, além das moradias encontra-se também distribuído em áreas não-habitadas (WHO, 2005). Estima-se que esta doença atinja cerca de 16-18 milhões de pessoas nas Américas, sendo que cerca de 120 milhões vivem em áreas de risco, ou seja, cerca de 25% dos latinos americanos estão sob o risco de contrair a doença e, 25-30% dos infectados irão progredir para um quadro irreversível de falência cardíaca, causando uma considerada morbidade e mortalidade (WHO, 2005).

Atualmente a quimioterapia da doença de Chagas é baseada nas únicas drogas disponíveis que são o nitrofurano nifurtimox (Bayer, recentemente descontinuado) e o nitroimidazol benznidazol (Roche). Ela é insatisfatória já que estas drogas têm atividade significativa apenas nas fases aguda e crônica recente (com poucos anos de infecção) (Sosa Estani *et al.*, 1998), e sua eficácia varia de acordo com a área geográfica, provavelmente devido a diferenças na susceptibilidade às drogas entre

diferentes cepas de *T. cruzi* (Filardi; Brener, 1982, 1987; Croft; Snowdon; Yarley, 1996). Os efeitos colaterais frequentes destas drogas são anorexia, vômito, polineuropatia periférica e dermatia alérgica. Entretanto, a principal limitação destes compostos é sua eficácia extremamente baixa na forma crônica estabelecida da doença (Urbina, 2002).

Novas tentativas vêm sendo testadas para melhorar a caracterização do *T. cruzi* e do seu vetor nas áreas de pesquisa básica, clínica, diagnóstica e epidemiológica, além de novas tentativas também no controle da própria doença. Uma nova possibilidade é o transplante autólogo de células – tronco na circulação de pacientes com cardiopatias. Nesses pacientes observou-se uma melhora de cerca de 30% nas funções cardíacas após o transplante, sendo que um caso apresentou melhora em apenas um mês após a intervenção (WHO, 2005).

1.2. Classificação Taxonômica (Hoare, 1964)

Filo Protozoa

Sub-filo Sarcomastigophora

Super-classe Mastigophora

Classe Zoomastigophorea

Ordem Kinetoplastida

Sub-ordem Trypanosomatina

Família Trypanosomatidae

Gênero *Trypanosoma*

Espécie *Trypanosoma cruzi*

1.3. Formas evolutivas e ciclo biológico.

O *Trypanosoma cruzi* tem um ciclo biológico complexo que é caracterizado pela presença de três estágios de desenvolvimento em dois hospedeiros diferentes: o inseto vetor, um hemíptero da família Reduviidae e conhecido como barbeiro e um hospedeiro vertebrado como, por exemplo, o homem e outros mamíferos. Estudos recentes usando análises de isoenzimas, análise de rRNA, seqüências de mini-exons e marcadores de microsátélites, apresentam evidências de que o *T.cruzi* não é um único grupo filogenético, mas sim dois subgrupos genéticos altamente divergentes designados como linhagens I e II. A linhagem I predomina no ciclo doméstico enquanto a linhagem II representa o ciclo silvestre (Zingales *et al*, 1999; Fernandes *et al*, 1998; Briones *et al*, 1999).

As cepas pertencentes à linhagem I são caracterizadas com zimodemo Z1 (um zimodemo é um grupo que apresenta o mesmo perfil de isoenzimas), 24S α rDNA grupo 2 e um mini-exon do grupo 2, sendo capazes de induzir um baixo parasitismo em humanos. Ao contrário da linhagem I, a linhagem II é caracterizada pelo zimodemo Z2, 24S α rDNA grupo 1 e um mini-exon do grupo 1 e causa altas parasitemias em humanos em áreas endêmicas (Zingales *et al*, 1999). Pelo menos no caso do Brasil, a linhagem II parece ser a única responsável pelas lesões teciduais vistas em pacientes chagásicos (Freitas *et al*, 2005). Esses dois grupos foram primeiramente denominados ZI e ZII e, mais recentemente, um terceiro grupo chamado ZIII foi descrito, baseado em isolados da região Amazônica. Essas nomenclaturas foram recentemente revisadas e renomeadas como Tc I, Tc II e ZIII, respectivamente (Junqueira; Degraives; Brandão, 2005; Brandão; Fernandes, 2006).

Os protozoários da família Trypanosomatidae são caracterizados por possuírem várias formas diferentes durante seu ciclo de vida (Figura 1). No caso do *T. cruzi*, as três

diferentes formas podem ser facilmente identificadas por microscopia óptica: (a) forma amastigota, com cerca de 3 a 5µm de diâmetro, sendo replicativa dentro do hospedeiro vertebrado e capaz de se transformar na forma epimastigota no intestino do inseto vetor. Possui um flagelo curto, não visível à microscopia óptica e o cinetoplasto em forma de bastão e localizado anterior ao núcleo. Estudos anteriores utilizando amastigotas obtidos de diferentes fontes mostram que essa forma é capaz de infectar células de vertebrados (Carvalho; De Souza, 1986; Ley *et al*, 1990; Mortara, 1991, Fernandes *et al*, 2006).

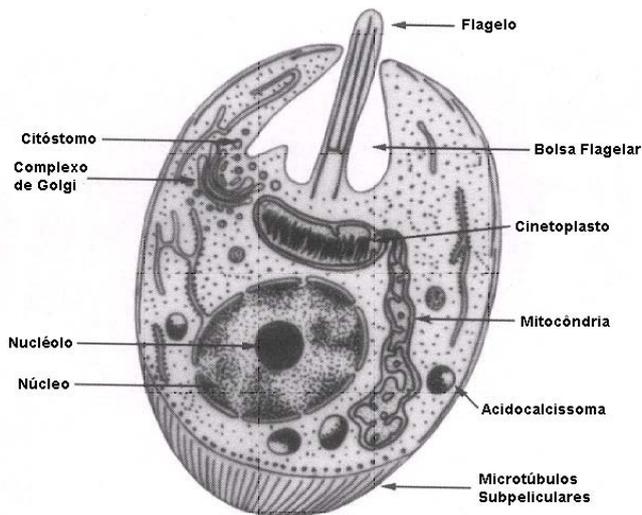
A forma epimastigota (b), estágio replicativo no intestino do inseto vetor, caracteriza-se por possuir uma forma alongada, com cerca de 20 a 40 µm de comprimento. O cinetoplasto, em forma de bastão, é localizado antero-lateralmente ao núcleo e essa forma tem a capacidade de se multiplicar em cultura axênica. Durante esse estágio, a forma epimastigota adere, pelo flagelo, as células da mucosa intestinal e dos túbulos de Malpighi, mas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos colonizam preferencialmente a região do reto (Schmidt; Klemann; Schaub, 1998). Além disso, epimastigotas também podem ser achados dentro de células de vertebrados, no final do ciclo intracelular, quando os amastigotas se transformam em tripomastigotas ou vice versa, no início de um novo ciclo quando tripomastigotas transformam-se em amastigotas (revisto por De Souza, 2002).

A forma infectante do *T.cruzi*, a forma tripomastigota (c), possui cerca de 25 µm de comprimento e 2µm de diâmetro. O cinetoplasto, em formato arredondado, é localizado posteriormente ao núcleo. Pode-se encontrar tripomastigotas: (1) em células, no final do ciclo intracelular; (2) no meio extracelular ou livres na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado; (3) na porção posterior do intestino, nas fezes e na urina do hospedeiro invertebrado. Essas formas são incapazes de se dividir e infectam vários tipos celulares, como macrófago, considerado o primeiro sítio de invasão, além de

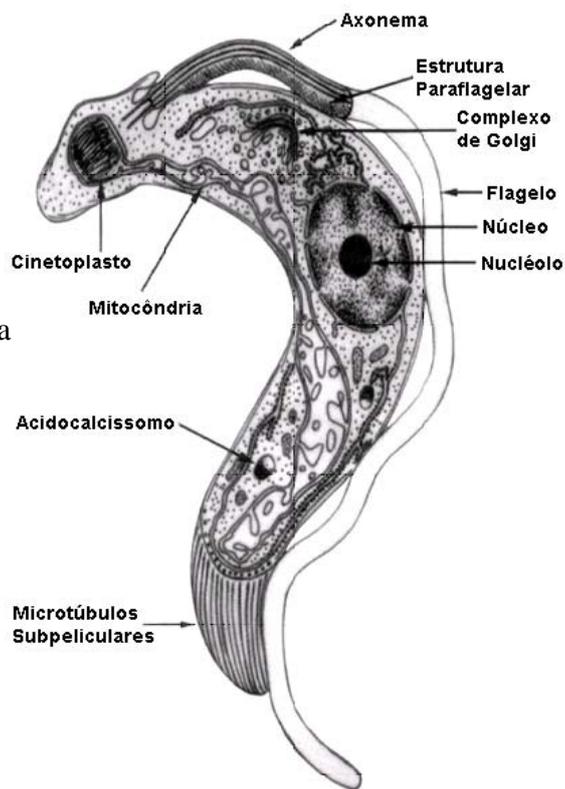
muitos outros tipos celulares, como células musculares cardíacas (revisto por De Souza, 2002).

O ciclo biológico do *T.cruzi* começa quando o hospedeiro invertebrado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado (Figura 2). O hospedeiro invertebrado, conhecido como barbeiro, é um inseto da ordem Hemiptera, família Reduviidae, sendo espécies como a *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* as mais comuns. Durante a alimentação, as formas amastigota e tripomastigota do sangue do vertebrado infectado são ingeridas pelo inseto. No estômago do inseto, essa forma se diferencia em epimastigota e em algumas formas intermediárias arredondadas. No intestino do inseto, a forma epimastigota se divide muitas vezes por divisão binária e adere, por ligações hidrofóbicas, na cutícula da parede do intestino, antes de diferenciar-se para formas tripomastigotas metacíclicas (revisto por Tyler; Engman, 2001). O processo de metaciclogênese é regulado por essas ligações hidrofóbicas entre o flagelo e o substrato onde está aderido (Bonaldo *et al*, 1988) e é um processo mediado por c-AMP (González - Perdomo; Romero; Goldener, 1988). Uma vez transformados, os tripomastigotas metacíclicos se soltam da parede do intestino e chegam ao reto, sendo excretados nas fezes e na urina, sendo capazes de infectar o hospedeiro vertebrado, no momento que o inseto se alimentar novamente (revisto por Kolien; Schaub, 2000; Brack, 1968; Garcia; Azambuja, 1991; Zeledon; Alvarenga; Schosinsky, 1997).

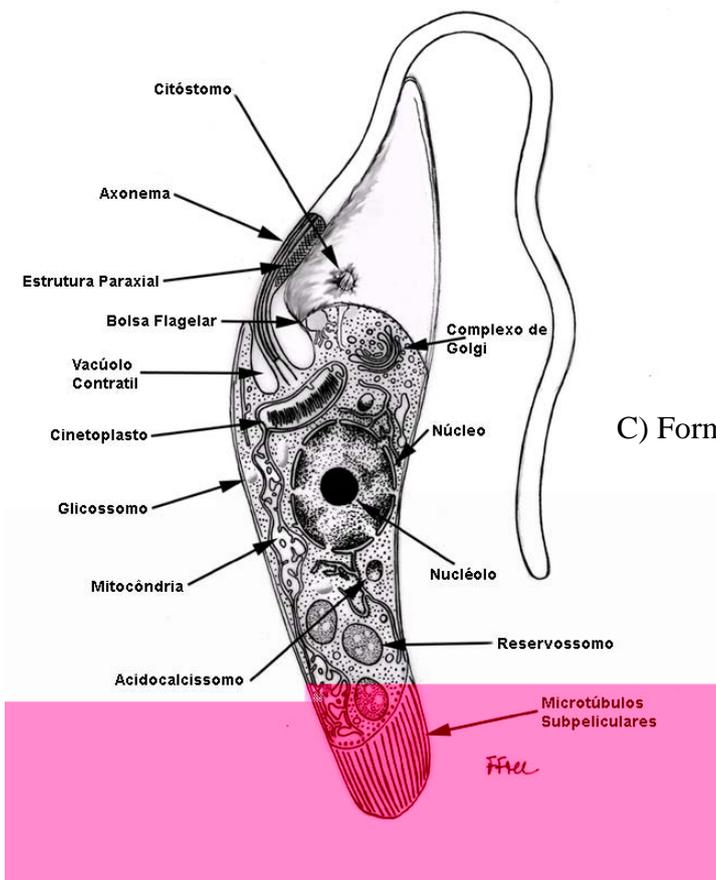
O tripomastigota metacíclico liberado nas fezes e na urina pelo inseto vetor é capaz de penetrar no hospedeiro vertebrado através de mucosas ou lesões na pele, seja ela a própria picada ou causadas pelo ato de coçar a pele após a picada do inseto, iniciando o ciclo intracelular do *T.cruzi*.



A) Forma Amastigota



B) Forma Tripomastigota



C) Forma Epimastigota

FIGURA 1: Esquemas representando as três formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. Retirado de Brenner, Andrade e Barral-Neto; *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (capítulo 7) - Segunda edição- 2000.

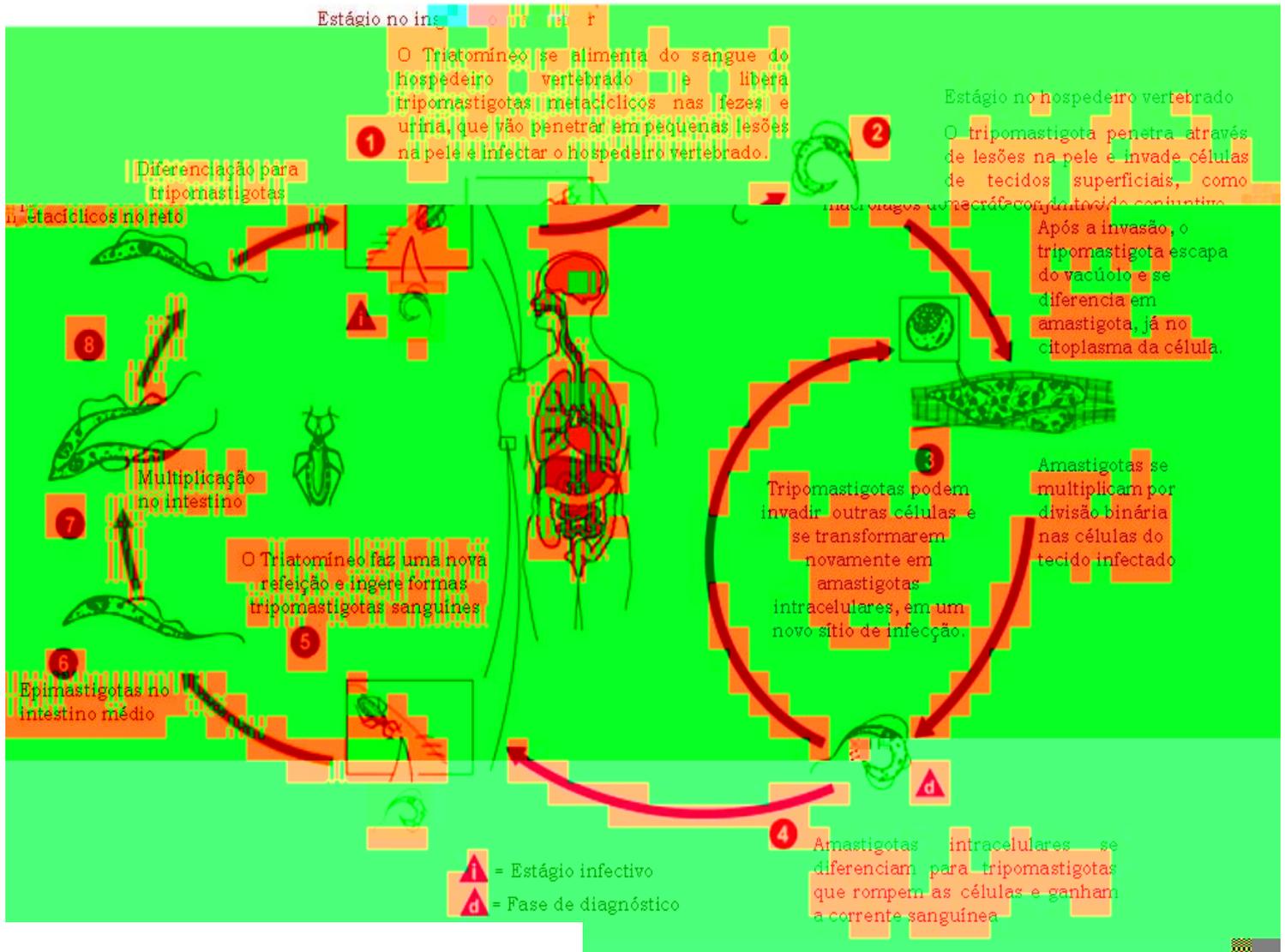


FIGURA 2: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.)

1.4. A interação *Trypanosoma cruzi* – célula hospedeira e o ciclo intracelular.

In vitro, formas tripomastigotas têm a capacidade de invadir e proliferar em qualquer linhagem celular de mamífero mantida em cultura (Araújo-Jorge, 1989; Araújo – Jorge; Barbosa; Meirelles, 1992; Burleigh; Andrews, 1995a). O ciclo intracelular do *T.cruzi* dura aproximadamente sete dias (cepa Y) e começa no momento da invasão do tripomastigota na célula hospedeira, onde uma cascata de sinalização culmina com o fechamento do vacúolo parasitóforo onde se encontra o parasita. (Rodriguez *et al*, 1996, revisto em De Souza, 2005). Ao contrário de outros parasitas intracelulares obrigatórios como o *Toxoplasma gondii*, que evita a fusão do vacúolo contendo taquizoítos com lisossomas da célula hospedeira (Revisto por Sinai; Joiner, 1997; Amer; Swanson, 2002), a fusão do vacúolo contendo tripomastigotas com compartimentos da via endossomal da célula hospedeira parece ser um pré requisito para sobrevivência do parasita (Ley *et al*, 1990, Andrade; Andrews, 2004, Burleigh, 2005). A exposição do parasita a esse ambiente ácido dispara a atividade de uma porina secretada pelo *T.cruzi*, a Tc-Tox, permitindo que o parasita lise a membrana do vacúolo e fique livre no citoplasma da célula hospedeira (Andrews e Whitlow, 1989). Uma vez no citoplasma, a forma tripomastigota se diferencia para forma amastigota, estágio replicativo intracelular, que após uma fase estacionária inicia uma série de divisões binárias até que todo citoplasma da célula hospedeira esteja preenchido. No final do ciclo de multiplicações, essas formas reiniciam uma diferenciação para tripomastigotas que, num dado momento, vão romper a membrana da célula hospedeira e ganhar o meio extracelular, sendo capazes assim de ganhar a corrente sanguínea e infectarem novas células (Revisto por De Souza, 2002).

Para que o evento de invasão aconteça, o reconhecimento entre o parasito e a célula hospedeira precisa acontecer previamente. Esse reconhecimento está relacionado

principalmente a glicoconjugados de superfície que apresentam resíduos de ácido siálico ou de galactose/ N-acetil galactosamina, localizados na superfície de ambas as células (Araújo-Jorge; De Souza, 1984, 1986, 1988; Souto Pádrón *et al*, 1984; Souto Padrón; De Souza, 1985; Ciavaglia; Carvalho; De Souza, 1993; Vermelho; Meirelles, 1994; Burleigh; Andrews, 1995b). A exposição desses resíduos, tanto no parasito quanto na célula hospedeira pode ser modificada pela atividade de uma família de glicoproteínas associadas à superfície de formas tripomastigotas através de âncoras de GPI, denominadas *trans*-sialidases. Sua atividade consiste na remoção de resíduos de ácido siálico de um substrato, que pode ser uma molécula solúvel no meio ou presente na superfície de uma das células e, transferência para uma glicoproteína aceptora presente na superfície do parasito ou da célula hospedeira (Vermelho; Meirelles, 1994, Burleigh; Andrews, 1995b). Dados recentes indicam que essa molécula também está envolvida na capacidade de agilizar o escape do vacúolo formado ao redor de tripomastigotas provenientes do sobrenadante culturas infectadas quando colocados em contato com tipos celulares como HeLa e CHO (Rubin-De-Celis *et al*, 2006). Esse tipo de molécula pertence a uma família multigênica que codifica para um grupo heterogêneo de proteínas, com pesos moleculares variando entre 100 e 200 kDa. Formas epimastigotas apresentam a enzima na forma monomérica e com baixa atividade. Esta aumenta quando a cultura atinge a forma estacionária e, principalmente, quando inicia o processo de metaciclogênese. Conseqüentemente, a forma tripomastigota expressa grande quantidade de *trans*-sialidase como uma forma multimérica ligada à membrana plasmática por meio de uma âncora de GPI sensível à ação da fosfolipase C. Dados bioquímicos disponíveis indicam que a enzima desaparece durante a transformação tripomastigota-amastigota no interior da célula hospedeira, reaparecendo posteriormente quando novos tripomastigotas são formados. Estudos imunocitoquímicos, no entanto,

mostram a presença da proteína na forma amastigota (Souto-Padrón; Harth; De Souza, 1990; Schenkman *et al*, 1991a, 1993; Pereira *et al*, 1996).

Foi verificado que a *trans*-sialidase não está presente na superfície de todos os tripomastigotas podendo ser apresentada por apenas cerca de 20% da população (Pereira *et al*, 1996), sendo estes mais invasivos. Essa *trans*-sialidase remove resíduos de ácido siálico preferencialmente ligados na posição α 2-3, transferindo-o para a molécula aceptora, representada por proteínas glicosiladas de 70-200 kDa, conhecidas como Ssp3 (Schenkman; Eichinger, 1993) e, para moléculas de 35-50 kDa encontradas em tripomastigotas metacíclicos (Santori *et al*, 1996). A família das *trans*-sialidases também inclui outras glicoproteínas que não apresentam essa atividade enzimática, mas também estão envolvidas no processo de interação parasito-célula, como a glicoproteína de 85 KDa, chamada de Tc85 (Colli; Alves, 1999). Tem sido demonstrado que essa molécula apresenta propriedades aderentes à laminina e carrega um segmento carboxi-terminal que se liga a citoqueratina 18 (Magdesian *et al*, 2001). Todeschini *et al* (2004) sugerem que moléculas enzimáticas inativas da família das *trans*-sialidases são proteínas ligadoras de ácido siálico e Galp e podem ter um papel relevante na infecção por *T. cruzi*, já que a inibição da atividade *trans*-sialidase baseado em análogos de ácido siálico podem transformar a TS do parasita em uma lectina do tipo ligadora de Galp. Além disso, galactosídeos/sialosídeos polivalentes podem ser uma possível arma para a síntese de inibidores de *trans*-sialidases seletivos, aumentando as chances de inibir a entrada do parasita substancialmente.

Na interação com macrófagos, os dados indicam que a presença do ácido siálico na superfície da forma tripomastigota dificulta o processo de interação, de tal maneira que a sua retirada por tratamento com neuraminidase ou seu bloqueio mediante oxidação por ácido peródico ou incubação com a lectina de *Limax flavus* ou *Limulus*

polyphemus aumenta significativamente a adesão dos parasitos e posterior penetração. Tratamento semelhante não interfere significativamente no processo de interação do *T. cruzi* com células não-fagocíticas. É muito provável que o aumento na entrada do parasito dessializado em macrófagos seja devido ao seu reconhecimento por receptores para galactose/N-acetil galactosamina presentes na superfície de macrófagos. Foi mostrado que a adição de galactose ao meio de interação interfere na adesão de *T. cruzi* dessializado à superfície de macrófagos (Araújo-Jorge; De Souza, 1988; Araújo-Jorge *et al*, 1992) ou células CHO (Ciavaglia; Carvalho; De Souza, 1993). Os dados existentes indicam claramente que resíduos de ácido siálico na superfície da célula hospedeira desempenham papel importante neste processo. As formas tripomastigotas penetram mais em células contendo ácido siálico exposto do que naquelas que expõem galactose (Araújo-Jorge; De Souza, 1984, 1988).

Vem sendo demonstrado nos últimos anos que os mecanismos que levam a internalização do parasita parecem ser diferentes de acordo com o tipo celular em questão. Evidências morfológicas mostram que o parasita penetra na célula hospedeira através de um processo endocítico, que culmina com a formação de um vacúolo parasitóforo contendo o parasita. Em células como macrófagos, conhecidos como fagócitos profissionais, e que fazem parte do sistema mononuclear fagocítico (van Furth *et al*, 1972), constata-se a formação de projeções na superfície da célula hospedeira, lembrando um processo fagocítico clássico (Nogueira; Cohn, 1976; revisto por De Souza, 2002). Outros autores, em estudos iniciais, demonstraram que o parasita forçava a membrana da célula hospedeira, induzindo uma entrada ativa (Dvorak; Schmunis, 1972, Kipnis; Calich; Da Silva, 1979). Já em células fagocíticas não - profissionais, o parasita parece ser o agente de penetração na célula hospedeira, caracterizando um processo ativo. Schenkman; Robbins; Nussenzweig (1991) demonstraram, utilizando

fibroblastos e células epiteliais, que a adesão de formas tripomastigotas à superfície da célula hospedeira envolve gasto de energia do parasita e é independente de actina. Esse resultado foi obtido a partir do sucesso obtido na infecção de células previamente fixadas e na constatação que após o tratamento com citocalasina D a taxa de invasão do parasita não havia sido significativamente alterada. Rodriguez *et al* (1996) mostraram que a migração de lisossomos descrita por Tardieux *et al* (1992) e revista por Burleigh; Andrews (1995) possui uma dependência de estruturas como microtúbulos e de proteínas motoras como cinesinas, típico de movimentos anterógrados de compartimentos citoplasmáticos. Burleigh; Andrews (1995) sugerem que essa resposta celular só ocorre após a despolimerização da rede cortical de actina. Essa hipótese foi confirmada mais tarde por Rodriguez *et al* (1995), que demonstraram que a ligação do parasito à superfície levava a um rearranjo do citoesqueleto, envolvendo a remoção dos filamentos de actina localizados na superfície da célula. Entretanto, Rosestolato *et al* (2002) utilizando diferentes tipos celulares (células fagocíticas e células não-fagocíticas), mostraram que existe uma redução na taxa de invasão do parasita após o tratamento da célula hospedeira com citocalasina, envolvendo, portanto, a participação do citoesqueleto da célula hospedeira.

Por outro lado, é importante ressaltar que os parasitas penetram por outros processos, sem a concentração de actina ao redor do parasita no sítio de entrada (Carvalho *et al*, 1999 e Rosestolato *et al*, 2002). Dessa maneira, sugere-se que o *T. cruzi* pode invadir células através de vários mecanismos: (a) um processo tipicamente fagocítico envolvendo a formação de pseudópodos, dependente da polimerização dos filamentos de actina; (b) um processo endocítico que não depende da formação de pseudópodos, mas depende da polimerização de actina para internalização do parasita; (c) um processo endocítico que não depende da polimerização de actina. No entanto,

trabalhos mais recentes sugerem que o tratamento com citocalasina D retarda uma associação inicial de lisossomos e aumenta a taxa de invasão por uma rota independente da fusão de lisossomos, além de que o parasita seria capaz de modular a atividade de GTPases como a RhoA, mas não Rac e Cdc42 nos momentos iniciais da invasão, já que foi observado um aumento significativo na invasão de células RhoA negativas, similar ao aumento observado após o tratamento com citocalasina D (Woolsey; Burleigh, 2004), ou seja, esses resultados sugerem que a despolimerização do citoesqueleto de actina facilitaria a entrada do parasita e que a rota de entrada inclui uma fusão com lisossomos, como havia sido descrito anteriormente (Tardieux *et al* 1992; Rodriguez *et al*, 1995; Andrews, 2002).

Andrade; Andrews (2004) sugerem que tripomastigotas são capazes de invadir células por um processo de invaginação da membrana da célula hospedeira, formando um vacúolo “reversível” que pode liberar o parasita de volta para o meio extracelular. No entanto, esse processo reversível só pode ocorrer antes da fusão com lisossomos, tanto no momento da entrada quanto imediatamente após, sendo um evento crítico para que o parasita complete seu ciclo intracelular e estabeleça uma infecção produtiva.

Independente do mecanismo pelo qual o parasita invade a célula hospedeira, o processo de interação *T.cruzi* – célula hospedeira pode ser analisado como um processo de reconhecimento célula-célula. Como em outros sistemas biológicos, essa interação ativa vias de transdução de sinal a partir do momento da formação do complexo receptor ligante (Magee, 1995). Portanto, mecanismos de sinalização celular certamente estão envolvidos na invasão de tripomastigotas de *T.cruzi* em células de mamíferos, mediando as diferentes repostas celulares provocadas pela adesão do parasita à superfície da célula hospedeira.

A sinalização gerada através de receptores de TGF- β mostrou-se necessária na

invasão de tripomastigotas em células epiteliais (Ming; Ewen; Pereira, 1995; Hall; Pereira, 2000). Células deficientes para receptores de TGF- β mostraram-se resistentes à infecção pelo parasita, uma consequência da sinalização defeituosa já que os parasitas são capazes de aderir na membrana da célula hospedeira, sem invadi-las. Ming; Ewen; Pereira, (1995) também propuseram que a forma infectiva do parasita expressa um ligante para TGF- β que é capaz de disparar a via de sinalização em células de mamíferos através da ligação com receptores de TGF- β da célula hospedeira, promovendo a infecção.

Sabe-se que os níveis de Ca²⁺ intracelular são modulados após a ligação do parasita na célula hospedeira, constituindo uma importante via de sinalização disparada pelo parasita (Tardieux; Nathason; Andrews, 1994, Yakubu; Majumder; Kierszenbaum, 1994, Moreno *et al*, 1994, Rodriguez *et al*, 1995, Dorta *et al*, 1995, Wilkowsky; Wainszelbaum; Isola, 1996, Caler *et al*, 2000, Scharfstein *et al*, 2000). Aumentos repetidos no transiente de Ca²⁺ intracelular foram observados em células de mamíferos em resposta à adesão de tripomastigotas vivos, sugerindo que a invasão leve de 8 a 10 minutos e seja resultado de um efeito cumulativo de repetidos eventos de sinalização celular (Rodriguez *et al*, 1996). A elevação transiente nos níveis de cálcio intracelular tanto do parasito quanto de células hospedeiras é disparada no momento da invasão e é crucial para a finalização do processo de infecção. Em fibroblastos, esses aumentos transientes de Ca²⁺ parecem ser dependentes de proteína G (Tardieux; Nathason; Andrews, 1994) e da ação de fosfolipase C, gerando produtos como inositol 3, 4, 5 trifosfato a partir de fosfatidilinosítídeos (Rodriguez *et al*, 1995), sendo disparados por um fator solúvel, ainda não definido, gerado por proteólise pelo parasito (Burleigh; Andrews, 1995a). Dorta *et al* (1995) sugerem que o disparo no pulso de Ca²⁺ intracelular na célula hospedeira seria provocado, no caso de tripomastigotas

metacíclicos, pela proteína de 35/50 kDa presente na superfície do parasito e, no caso de tripomastigotas obtidos do sobrenadante de culturas infectadas, por uma proteína de cerca de 85 kDa, ambas descritas anteriormente como participantes no processo de reconhecimento e invasão do parasito. Essas proteínas ancoradas por GPI na superfície do *T.cruzi* modulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos (Camargo *et al*, 1997, Gazzinelli *et al*, 1997). A âncora de GPI de proteínas tipo mucina é necessária e suficiente para disparar a produção de citocinas (Gazzinelli *et al*, 1997), induzir a ativação de quinases (Tachado *et al*, 1997) e a produção de óxido nítrico em macrófagos (Camargo *et al*, 1997). A remoção da cadeia de ácidos graxos da âncora de GPI não inibe a capacidade de ativar tirosinas quinases, mas inibe a capacidade de ativar proteína quinase C ou induzir o fator de necrose tumoral (TNF α) e a produção de interleucina 1 (IL1) (Tachado *et al*, 1997).

O processo de invasão do *T.cruzi* nas células hospedeiras envolve mecanismo de fosforilação e defosforilação de proteínas, ativando outra via de transdução de sinal na célula alvo. O tratamento prévio das células com drogas que inibem proteínas quinases (por exemplo, staurosporina e genisteína) inibe significativamente a infecção das células (Vieira; Carvalho; De Souza, 1994). Além da via de sinalização ativada por proteínas tirosina quinases, outra via recentemente descrita como importante no processo de invasão do *T.cruzi* é a via da fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K). Essa proteína quinase lipídica é uma enzima composta por duas subunidades (Rameh; Cantley, 1999): uma catalítica (p110), que promove a geração do fosfatidil inositol 3, 4,5 trifosfato a partir de inositol 4,5 bifosfato, e outra subunidade regulatória (p85), que possui um domínio SH₂ responsável pela ligação aos resíduos de fosfotirosina e a conseqüente ativação da subunidade catalítica p110 (Vanhaesebroeck *et al*, 1997). A atividade dessa enzima é aumentada quando tripomastigotas aderem na superfície da

célula alvo sendo que, quando inibida por compostos como a wortmanina, observa-se uma redução drástica na taxa de invasão do parasito (Todorov *et al*, 2000, Dutra, 2000, Vieira *et al*, 2002). Baseado nas evidências relacionadas às vias de sinalização disparadas durante o processo de invasão do *T.cruzi*, Vieira; Carvalho; De Souza (1994), demonstraram que a fosforilação de proteínas do macrófago em resíduos de tirosina é um evento necessário para a invasão de formas tripomastigotas. Também foi demonstrado, pelo mesmo grupo, que os resíduos de tirosina fosforilada são acumulados em regiões do macrófago onde o parasita está sendo internalizado, colocalizando-se com condensação de microfilamentos de actina (Vieira *et al*, 2002).

Já a sinalização disparada pela ativação da PI3 quinase também envolve resíduos fosforilados de tirosina, assim como a presença da condensação de actina no sítio de entrada de tripomastigotas em macrófagos. Tem sido descrito que a subunidade regulatória p85 possui um domínio Bcr, o qual permite sua interação com a GTPase monomérica e reguladora do citoesqueleto de actina, Rac. Foi mostrado que esta interação aumenta a atividade GTPásica da Rac em cerca de 3 vezes e promove a reorganização de filamentos de actina (Bokoch *et al*, 1996). Atualmente, as GTPases da família Ras, especialmente as da subfamília Rho, como RhoA, Rac1 e Cdc42 tem sido vistas como importantes chaves na compreensão dos mecanismos de sinalização e modulação do citoesqueleto de actina. Trabalhos recentes mostram que células mutantes para RhoA, Cdc42 e Rac1 mostram um perfil diferenciado de infecção, especialmente as linhagens dominante positivo e negativo para Rac1 onde as taxas de invasão e sobrevivência são maiores que nos outros mutantes, sugerindo uma participação dessa GTPase no processo de invasão (Fernandes; Mortara, 2004; Dutra *et al*, 2005)

1.5. O vacúolo parasitóforo e o escape para o citoplasma.

Independentemente do mecanismo usado para penetrar na célula hospedeira, o parasito é visto dentro de um vacúolo parasitóforo circundado por membrana. Há muitos dados que mostram que algumas, mas não todas, as moléculas encontradas na membrana plasmática da célula hospedeira são internalizadas e fazem parte do vacúolo parasitóforo (Meirelles; De Souza, 1986, Carvalho *et al*, 1999).

Após a penetração do parasito e até durante a fase inicial de internalização, componentes do sistema endossomal da célula hospedeira se fundem com o vacúolo parasitóforo descarregando seu conteúdo, tornando-o um compartimento ácido (Carvalho; De Souza, 1989; De Souza, 2002).

Logo após o processo de invasão, quando a forma tripomastigota se encontra no interior do vacúolo parasitóforo, três processos ocorrem. O primeiro refere-se ao fato de que organelas do sistema endolisossomal da célula hospedeira aproximam-se do vacúolo e fundem-se com ele, incorporando suas membranas à membrana do vacúolo parasitóforo e descarregando seu conteúdo no interior do vacúolo, que se torna ácido (Milder; Kloetzel; Deane, 1973; Nogueira; Cohn, 1976; Carvalho; De Souza, 1989, revisto em De Souza, 2005). Nessa fase podemos encontrar no vacúolo fosfatase ácida e glicoproteínas marcadoras de lisossomas, como as proteínas de membrana associada a lisossomo (LAMPs). O vacúolo parasitóforo neste momento corresponde a um grande fagolisossoma. O segundo processo consiste na mudança gradual da forma do parasito, que se inicia pelo arredondamento, fazendo com que o flagelo fique todo associado ao corpo, seguido pelo encurtamento do flagelo e mudança da estrutura do cinetoplasto, que adquire a forma de bastão. Neste processo podemos encontrar formas intermediárias que lembram uma forma epimastigota. O terceiro processo, que tem início cerca de duas horas após o contato inicial, consiste na fragmentação da membrana

do vacúolo parasitóforo, possivelmente pela ação de enzimas liberadas pelo parasito (Nogueira; Cohn, 1976; Carvalho; De Souza, 1989). Esse processo requer a existência de um compartimento ácido, podendo ser manipulado pelo aumento artificial do pH com o uso de drogas como a cloroquina, cloreto de amônia ou monensina. O ambiente acídico parece ser favorável à secreção pelo parasito de uma molécula tripsina-sensível, conhecida como a Tc-Tox (Andrews, 1990), que tem a capacidade de, em ambiente acídico, incorporar-se à membrana do vacúolo parasitóforo, levando à sua lise.

Com a fragmentação da membrana e sua posterior total desintegração, a forma arredondada do *T. cruzi* passa a viver em contato direto com os componentes citoplasmáticos da célula hospedeira e inicia vários ciclos de divisão binária até tomar por completo o volume do citoplasma da célula infectada (De Souza, 2002).

O processo de divisão celular da forma amastigota tem início cerca de 24 h após a penetração do parasito. Ocorre um aumento gradual do tamanho do corpo do parasito, quando podemos observar a duplicação do corpúsculo basal, início da divisão do cinetoplasto e modificação na distribuição da cromatina. Um novo flagelo começa a ser formado. Gradualmente, o núcleo, que era redondo, adquire um aspecto ovalado e, posteriormente, alongado. Com o prosseguimento do processo de divisão, ocorre uma constrição no meio do núcleo, dando origem a dois novos núcleos. Nessa fase, a célula já conta com dois cinetoplastos e o corpo celular também já adquiriu um aspecto alongado. Ocorre então uma constrição citoplasmática, que leva à formação de duas formas independentes (De Souza, 2002).

A partir da primeira divisão, novas divisões passam a ocorrer com um tempo de geração de cerca de 14 horas, variável com a cepa, a natureza da célula hospedeira, temperatura, etc. O processo de citocinese é relativamente rápido, ocorrendo em cerca de 25 minutos. Divisões sucessivas levam à formação de dezenas de formas

amastigotas, que vão ocupando todo o citoplasma da célula hospedeira. Para alguns, o número de parasitos formados no interior de uma célula, provenientes de um único tripomastigota que nela penetrou, encontra-se sob controle genético, de tal forma que o processo subsequente de transformação para a forma tripomastigota ocorre após completar um número pré-definido (cerca de nove) de divisões. Para outros, o fator limitante é a área citoplasmática disponível e, ao final do ciclo intracelular, quando um grande número de tripomastigotas é formado no interior da célula hospedeira, estes apresentam intenso movimento, deslocando as poucas organelas ainda existentes. Ocorre, então, uma ruptura brusca da célula hospedeira, com liberação de parasitos no espaço intercelular (De Souza, 2002).

1.6. O citoesqueleto e a sinalização celular disparada no momento da invasão – participação da paxilina.

A adesão de microorganismos a células de mamífero é frequentemente acompanhada por rearranjos no citoesqueleto para facilitar a interiorização do parasito. Procópio *et al*, (1998) investigaram a importância deste fenômeno na invasão de *T. cruzi*, utilizando drogas para despolimerizar microfilamentos (citocalasina D) ou microtúbulos (nocodazol). Eles testaram dois tipos celulares, células HeLa e Vero, com diferentes arranjos de citoesqueleto. O resultados obtidos foram que a citocalasina D diminuiu a invasão de células HeLa por amastigotas e aumentou a invasão por tripomastigotas. Em células Vero, a invasão por ambas as formas foi inibida. Já no caso do nocodazol, células HeLa tiveram a invasão inibida por ambas as formas. Resultados semelhantes foram obtidos por diversos outros autores (Nogueira; Cohn, 1976; Mortara, 1991; Schenkman *et al*, 1991b; Schenkman; Mortara, 1992; Tardieux *et al*, 1992; Barbosa; Meirelles, 1995).

Trabalhos anteriores haviam demonstrado que a fosforilação em tirosina é um pré-requisito para invasão de tripomastigotas em células fagocíticas como macrófago (Vieira; Carvalho; De Souza, 1994) e que esses eventos de fosforilação colocalizavam com uma concentração de actina no sítio de entrada do parasito. Como sugerido por Vieira *et al* (2002) pelo menos seis peptídeos tem seus níveis de fosforilação em tirosina aumentados quando macrófagos são infectados com tripomastigotas. Esses peptídeos têm seu peso molecular muito similar a proteínas fosforiladas durante a fagocitose de outras moléculas (Aderem; Uderhill, 1999; Greenberg, 1999; Kwiatkowska; Sobota, 1999) Bandas de peso molecular de 140, 120, 94, 73, 67 e 56 kDa correspondem a proteínas como fosfodiesterase PCL γ , Cbl, Vav, Syk, paxilina e Lyn, respectivamente e se tornaram possíveis alvos para elucidar um dos mecanismos de entrada do *T.cruzi*.

A paxilina é uma proteína citoplasmática de 68 kDa que se localiza em pequenos sítios de adesão celular à matrix extracelular, pontos chamados de adesão focal (Turner; Glenney; Burridge, 1990). É uma proteína adaptadora multi-domínios capaz de interagir com outras proteínas estruturais ou envolvidas nas vias de sinalização, como vinculina, FAK (quinase de adesão focal), PYK2 (outra quinase de adesão focal), Src e Crk.

Em uma primeira descrição, ela foi caracterizada como capaz de exibir um aumento significativo nos níveis de fosforilação em tirosina induzida por expressão de *v-src* (Glenney; Zokas, 1989). Entretanto, logo após os primeiros estudos, a paxilina foi purificada de células da musculatura lisa de moela de galinhas, uma abundante fonte de proteínas do citoesqueleto, e identificada como uma proteína parceira da vinculina na formação de adesão focal e da ligação com actina (Turner; Glenney; Burridge 1990). Foi então denominada paxilina, derivado do latim *paxillus*, ou seja, “estaca firme”,

consistente com a função de ligar filamentos de actina em sítios de adesão ricos em integrinas.

Em eucariotos superiores, três isoformas de paxilina já foram clonadas e identificadas. Paxilina α , a isoforma principal e mais expressa, enquanto as isoformas β e γ mostram uma expressão mais restrita (Mazaki; Hashimoto; Sabe, 1997). As isoformas β e γ contêm inserções de 34 e 48 aminoácidos respectivamente, entre os aminoácidos 277/278 (Esquema 2). Estudos iniciais demonstraram que a isoforma γ não estava ativa em camundongos (Mazaki *et al*, 1998), mas, aparentemente, as três isoformas parecem ser expressas em camundongos (Wylie; Chantler, 2001).

Hic -5 (clone-5 induzido por peróxido de hidrogênio), outro membro da família da paxilina, foi identificado após análises de TGF- β de osteoblastos de camundongos e de um c - DNA induzido por peróxido de hidrogênio que codifica uma proteína de 444 aminoácidos (Shibanuma *et al*, 1994) (Esquema 2). Baseado na homologia com a paxilina, estudos sugeriram que um splice da estrutura inteira da Hic - 5 dava origem a duas proteínas diferentes: uma que continha a extremidade amino-terminal LD-1 foi chamada de Hic-5 α e a parte menor, foi chamada de Hic-5 β (Zhang *et al*, 2000).

Leupaxina é um membro com 386 aminoácidos e 45 kDa, que é expresso majoritariamente em leucócitos, o que reflete esse nome (Lipsky; Beals; Staunton 1998). Leupaxina é alocada no cromossomo 11cen-11q12.3 e é codificado por 9 éxons, mas perde os exons 4 e 5 e, conseqüentemente, apresenta algumas modificações estruturais, mas preserva a mesma função e regulação da paxilina (Esquema 2).

1.7. Fosforilação da paxilina

O primeiro estudo sobre a fosforilação de paxilina durante eventos morfogênicos do processo de embriogênese (processo que envolve mudanças na sinalização mediada por integrinas e por fatores de crescimento) deixou a primeira impressão de que a paxilina podia responder por vários estímulos extracelulares (Turner, 1991). Apesar da adesão de ligantes via integrinas ser classicamente ligada à fosforilação em tirosina da paxilina (BurrIDGE; Turner; Romer, 1992) via ativação de FAK e Src quinases (Bellis; Miller; Turner, 1995, Schaller; Parsons, 1995), fica claro que uma infinidade de ligantes que sinalizam através de receptores transmembrana podem também levar a fosforilação de paxilina em resíduos de tirosina, o que nos sugere que no momento da adesão tripomastigotas possam atuar como ligantes para receptores transmembrana na superfície de células hospedeiras e disparar a cascata de sinalização para fosforilação da paxilina e o rearranjo do citoesqueleto, que culminaria na invasão da célula pelo parasita, processo já descrito para bactérias como *Campylobacter jejuni* (Monteville; Yoon; Konkel, 2003).

Além da *C.jejuni*, bactérias da espécie *Shigella flexneri* são capazes de invadir macrófagos da linhagem J774 através de um processo clássico de fagocitose (com formação de pseudópodes) com fosforilação em tirosina de uma série de proteínas, incluindo a paxilina (Kuwae *et al*, 2001), mas, por outro lado, algumas espécies de bactérias como *Legionella pneumophila* são capazes de defosforilar proteínas como paxilina e vinculina de protozoários da espécie *Hartmannella vermiformis* logo após a adesão na superfície do microorganismo, enquanto que o citoesqueleto não sofreu nenhuma alteração (Venkataraman; KwaiK, 2000; Venkataraman *et al*, 1998).

A paxilina atualmente é considerada como um ponto central entre o cruzamento das vias de transdução de sinais e modulação de fatores de crescimento e

adesão celular (Rozengurt, 1995; Turner, 2000; Schaller, 2001) e, um ponto comum entre essas duas vias é que ambas provocam mudanças na organização do citoesqueleto e no estado de proliferação celular.

Entre os ligantes para receptores tipo tirosina quinase que podem gerar sinalização para fosforilação da paxilina estão: fator de crescimento epidérmico (EGF) (Tapia *et al*, 1999), hormônio de crescimento (Ryu *et al*, 2000), fator de crescimento de hepatócitos (Herrera, 1998), fator de crescimento tipo insulina –1 (IGF-1) (Butler *et al*, 1997; Leventhal *et al*, 1997; Casamassima; Rozengurt, 1998), MCP-1 (Yamasaki *et al*, 2001), NGF (Melamede *et al*, 1995), Fator de crescimento derivado de plaquetas (Rankin *et al*, 1996), SCF (Scott; Liang; Luthra 1996), ferro (Takahira *et al*, 1997) e fator de crescimento endotelial (Abedi; Zachary, 1997).

TGF- β e activina – A, que estimulam a atividade de receptores serina/treonina quinase também estimulam, indiretamente, fosforilação em tirosina (Riedy *et al*, 1999) assim como agonistas de receptores transmembrana do tipo “seven - pass” como acetilcolina (Wang; Pavalko; Gunst, 1996), epinefrina (Zhong; Minnemam, 1999), angiotensina II, trombina (Turner *et al*, 1995), bombesina, vasopressina, endotelina (Zachary *et al*, 1993), bradicinina (Leeb – Lundberg; Song; Mathis, 1994), colecistocinina (Garcia *et al*, 1997, Yu *et al*, 2004), CSF-1 (Yeung *et al*, 1998), ácido lisofosfatídico (LPA) e outros metabólitos de esfingosina (Seufferlein; Rozengurt, 1994; 1995; Rozengurt, 1995).

A principal consequência da fosforilação de paxilina é o surgimento de um domínio de ligação funcional tipo SH2 que opera como uma região indutível da proteína e capaz de se ligar a outras proteínas com afinidade por domínios tipo SH2. A associação mais estudada do domínio SH2 é com proteínas adaptadoras Crk/CrkL, que se liga a resíduos pY31 e pY118 (Birge *et al*, 1993; Salgia *et al*, 1995; Schaller; Parson,

1995; Tsubouchi *et al*, 2002). Outra associação muito comum dos domínios SH2 é com a subunidade p85 da PI3 quinase e com a p120RasGAP (Tsubouchi *et al*, 2002), capazes de modular o citoesqueleto de actina.

Outros membros da família da paxilina também são fosforilados em resíduos de tirosina, como, por exemplo, Hic-5 que é fosforilada através de PYK2 (Matsuya *et al*, 1998), mas não pela FAK (Fujita *et al*, 1998) após a adesão e ativação mediada por plaquetas (Osada *et al*, 2001), estresse hiperosmótico, expressão de *v-src* e estimulação por LPA (Matsuya *et al*, 1998). Fosforilação de leupaxina já foi descrita (Lipsky; Beals; Staunton, 1998) e parece ocorrer no resíduo Y20, um sítio codificado no éxon 2 que, aparentemente corresponde ao sítio Y31 da paxilina.

As respostas aos estímulos extracelulares não se limitam ao aumento nos níveis de fosforilação em tirosina da paxilina, já que ACTH (Vilgrain *et al*, 1998), EGF (Ishiki *et al*, 1997), epinefrina (Miao *et al*, 2000), insulina (Konstantopoulos; Clark, 1996), IGF-1 (Guvakova; Surmaez, 1999) e óxido nítrico são capazes de iniciar a defosforilação da paxilina. Além desses fatores, sinais para deadesão também resultam em uma rápida defosforilação da paxilina (Burrige; Turner; Romer, 1992) pela ação da PKA (Han; Rubin, 1996; Howe; Juliano, 2000).

O papel da PKA no processo de defosforilação ainda não foi bem elucidado, mas estudos mostram que, RhoA, uma pequena GTPase monomérica da superfamília Ras, tem um papel fundamental na fosforilação da paxilina e, que, já que ativação de PKA tem como um dos alvos justamente fosforilar a RhoA, causando sua inativação, esse mecanismo levaria a uma perda “passiva” da fosforilação da paxilina, através de uma inibição dos sinais de fosforilação direcionados para paxilina, ou seja, o evento de fosforilação da RhoA não só desvia a sinalização para fosforilação da paxilina como

promove uma perda passiva dessa fosforilação (Ellerbroeck; Wennerberg; Burrige, 2003).

Além da PKA, a paxilina também interage com uma serina/treonina fosfatase, a PP2A e, mesmo sem saber se a paxilina é um substrato natural da PP2A, perturbações nessa associação e o conseqüente aumento da fosforilação em resíduos de serina do domínio LIM 3 aumentariam a metástase celular (Ito *et al*, 2000; Young; Liu; Meisinger, 2003).



ios e sítios de fosforilação em tirosina (PY), serina (PS) e treonina (PT) e todos os

1.8. Outros mecanismos de invasão – participação de domínios de membrana.

A sinalização de células de mamíferos com ligantes na sua superfície ocorre, na sua maioria, mediada por interações proteína-proteína. Isso inclui a interação *T.cruzi* com a célula hospedeira assim como a interação de outros patógenos e suas toxinas. Além da interação via proteínas, os últimos estudos têm demonstrado a importância dos lipídeos e de domínios especializados de lipídeo - as “plataformas de membrana” - nesse processo de interação (Duncan *et al*, 2004; Seveau *et al*, 2004; Hiller *et al*, 2003; van der Goot; Harder, 2001).

Segundo a definição mais recente dada em 2006 pelo “**The Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function**” *membrane - rafts* (plataformas de membrana) são pequenas regiões (100-200nm) heterogêneas, altamente dinâmicas, com domínios enriquecidos em esteróis e esfingolipídeos que concentram processos celulares. Pequenas rafts podem ser estabilizadas para formarem grandes plataformas através de interações protéicas e interações lipídeos-proteínas. As plataformas de membrana são resistentes à solubilização por detergentes e estão envolvidas em várias funções celulares como sinalização celular, endereçamento molecular e tráfego de membranas (Lafont *et al*, 1999, Simons; Ikonen, 1997).

A hipótese de que esses domínios de membranas sempre existiram na célula foi confirmada quando várias proteínas envolvidas em diferentes vias de sinalização foram encontradas em frações resistentes a detergente (DRM), dando assim origem a definição de plataformas de membrana *in vitro*. As várias controvérsias que cercam esses microdomínios estão relacionadas a essa definição *in vitro* de que essas frações seriam resistentes a extração por Triton X-100 (1%) e que seriam isolados através de gradientes de 5 – 30% de sacarose (Brown; Rose, 1992).

Um subtipo de plataforma de membrana, a cavéola, tem uma composição similar, mas com o mesmo aspecto morfológico muito bem caracterizado por invaginações na membrana plasmática (Duncan; Shin; Abraham, 2002; Anderson, 1998) e, ambos os domínios participam de eventos de transdução de sinais via moléculas ancoradas a eles (Duncan; Shin; Abraham, 2002; van der Goot; Harder, 2001).

Caveolina-1 foi detectada em células senescentes, associada à paxilina e FAK (quinase de adesão focal) em pontos de adesão focal, o que sugere que essa proteína participe das mudanças morfológicas do citoesqueleto de actina e da formação de fibras de estresse em casos de senescência (Cho *et al*, 2004). Proteínas da família da Src quinase, assim como seu regulador negativo Csk, estão presentes em uma forma inativa em fibroblastos de camundongos e, após um estímulo como o estresse oxidativo, ambas passam para um estado ativado onde as proteínas Csk regulam o nível de estresse oxidativo para retornar a atividade da Src quinase para um nível mais basal. Essa ligação Src-Csk ocorre via um domínio SH2 da Csk, que mantém ligação com uma proteína fosforilada em tirosina, nesse caso caveolina-1 e paxilina, sendo ambas fosforiladas na extremidade dos filamentos de actina, onde estes mantêm contato com a membrana plasmática (Cao; Sanguinetti; Mastick, 2004).

Similar a cavéolas, as plataformas de membrana são enriquecidas em fosfolípidos com ácidos graxos saturados, colesterol, esfingomiéline e glicosfingolípidos. Entretanto, ao contrário do observado em cavéolas - que são facilmente detectadas por seu diâmetro distinto (50-100nm) e por seu aspecto de invaginação na membrana - as plataformas de membrana não possuem uma proteína estabilizadora como a caveolina e não apresentam nenhuma característica morfológica evidente, necessitando do uso de vários marcadores para detectá-las *in vivo*.

1.9. Marcadores de plataformas de membrana.

Marcadores de plataformas de membrana vêm sendo utilizados de várias maneiras e demonstrando resultados diferenciados (Tabela 1). No caso de NBD-colesterol e do BODIPY-GM1, ambos foram excluídos dos microdomínios provavelmente por causa do volume e carga dos grupamentos NBD e BODIPY (Loura; Federov; Pietro, 2001). Já os fosfolipídeos com cabeças fluorescentes também estão excluídos como marcadores de plataformas de membrana em sistemas *in vivo*, com exceção do NBD-DPPE (Dietrich *et al*, 2001). No caso da filipina, outro marcador comumente usado para detectar plataformas de membrana, a toxicidade celular e uma tendência a induzir artificialmente a formação de microdomínios pela ação da droga, restringe seu uso ao material já fixado (Mukherjee *et al*, 1998; Sugii *et al*, 2003).

Atualmente muitos estudos tendem para o uso de marcadores secundários, mais comumente anticorpos ou toxinas, que se liguem a proteínas ou lipídeos específicos encontrados nas plataformas de membrana. Esses marcadores fluorescentes têm a vantagem de serem pequenos e facilmente conjugados, aumentando as chances de ligação em regiões mais internas dos microdomínios. É o caso da subunidade B da toxina do *Cholera spp*, cuja afinidade pelo gangliosídeo GM1 – componente majoritário de plataformas de membrana - é muito bem caracterizada. Essa subunidade B da toxina se liga especificamente ao glicosfingolipídeo GM1, no folheto externo de membranas, por exemplo, da membrana plasmática culminando com a internalização dessa subunidade feita por processos endocíticos dependentes de clatrina e cavéolas em vários tipos celulares estudados (Torgersen *et al*, 2001).

TABELA 1: Principais marcadores de plataformas de membrana (retirado e adaptado de Lagerholm *et al*, 2005).

| Marcador | Especificidade | Descrição | Referência |
|---|-----------------------------|---|---|
| Cy5-DMPE ^a | Membranas internas | Análogo de fosfolípido | Schutz <i>et al</i> , 2000 |
| NBD ^b -DPPE ^c | | Análogo de fosfolípido | Dietrich <i>et al</i> , 2001 |
| Marcadores lipofílicos | | Análogos de lipídeos | (Korlach <i>et al</i> , 1999) |
| Laurdan | | Marcador sensível a fases de fluidez da membrana | (Dietrich <i>et al</i> , 2001; Gaus <i>et al</i> , 2003) |
| Fl ^d -PEG ^e -colesterol | | Análogo de colesterol | Sato <i>et al</i> , 2004 |
| DHE ^f | | Análogo de colesterol | Mukherjee <i>et al</i> , 1998 |
| Filipina | Colesterol | Antibiótico poliênico | Norman <i>et al</i> , 1972 |
| NAP-22 | | Proteína neuronal | Khan <i>et al</i> , 2003 |
| Anticorpos peptídeos | | Ligam-se a domínios do colesterol LWYIK e sequências relacionadas | Kruth <i>et al</i> , 2001 Epanand, 2004 |
| Perfringolisina O | | toxina | Heijnen <i>et al</i> , 2003 |
| Lysenina | Esfingomielina | toxina | Shakor; Czurylo; Sobota, 2003 |
| CTB ^g | GM1 | toxina | (Kenworthy <i>et al</i> , 2000; Dietrich <i>et al</i> , 2002; Stauffer; Meyer, 1997 e Wilson <i>et al</i> , 2004) |
| Anticorpo | GM3 | Se liga a GM3 | Nores <i>et al</i> , 1987 |
| Anticorpo | GPI-APs ^h | Liga GPI-APs | (Kenworthy <i>et al</i> , 2000; Dietrich <i>et al</i> , 2002; Wilson <i>et al</i> , 2004) |
| Aerolisina GPI-GFP ⁱ | | toxina GPI-AP análogo | Fivaz <i>et al</i> , 2002 (Shvartsman <i>et al</i> , 2003; Kenworthy <i>et al</i> , 2004; Pralle <i>et al</i> , 2000) |
| Anticorpo | TM ^j proteínas | Liga-se a proteínas TM | Shvartsman <i>et al</i> , 2003 |
| TM-GFP ^k | | Proteínas TM | Kenworthy <i>et al</i> , 2004 |
| MHC | | Liga-se a receptores MHC | Vrljic <i>et al</i> , 2002 |
| GFP acilado | Folheto interno de membrana | Liga-se a proteínas aciladas | (Stauffer <i>et al</i> , 1987; Kenworthy <i>et al</i> , 2004; Niv <i>et al</i> , 1999 e 2002; Lommerse <i>et al</i> , 2004) |

- A:** 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamine
- B:** 7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl
- C:** 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-phosphatidylethanolamine
- D:** fluoresceína
- E:** polietilenoglicol
- F:** dehydroergosterol
- G:** toxina do cólera subunidade B
- H:** proteínas ancoradas via glicofosfatidilinositol
- I:** proteínas ancoradas via glicofosfatidilinositol ligadas à proteína verde fluorescente
- J:** transmembrana
- K:** proteína transmembrana fluorescente.

1.10. Plataformas de membrana, colesterol e a dinâmica do citoesqueleto.

Os mecanismos moleculares que levam uma célula a movimentar-se de forma polarizada é muito semelhante em vários tipos celulares e inclui a segregação de domínios de membrana para áreas restritas na célula, caracterizando um programa de polarização altamente conservado de leveduras até mamíferos. A segregação desses domínios desempenha um importante papel no estabelecimento e na manutenção da polaridade e função de células constitutivamente polarizadas como neurônios e células epiteliais. Alguns desses domínios segregam especificamente durante a migração celular para manter a polaridade durante o movimento celular (Mañes *et al*, 2003).

Muitos desses domínios surgiram da caracterização de membranas artificiais geradas a partir de lipídeos encontrados nas células. Existem três grandes classes de lipídeos nas células eucariotas (Esquema 3). **Glicerofosfolipídeos** são moléculas de diacilglicerol que tipicamente carregam cadeias aciladas de 16-18 átomos de carbono, sendo uma delas insaturada e, conseqüentemente, esses lipídeos tem temperatura de fusão (TF) mais baixa. **Esfingolipídeos** são moléculas de ceramida que geralmente carregam cadeias saturadas e aciladas de 16-26 átomos de carbono, tendo assim uma

alta temperatura de fusão. Glicosfingolípídeos pertencem a essa classe de esfingolípídeos, onde o fosfato é substituído por açúcares de complexidade variável. **Esteróis**, sendo o colesterol a forma majoritária em mamíferos, são moléculas formadas por estruturas hidrofóbicas, cíclicas de 4 carbonos e representam 30-50% dos lipídeos de membrana de células de mamíferos (Mañes; Martinez-A, 2004).

Bicamadas lipídicas compostas de fosfolipídios com altas e baixas temperaturas de fusão podem formar duas fases distintas: uma fase gel semi-sólida (l_0) e uma fase de desordem líquida (l_d) que, em alguns casos, é chamada de fase líquida “cristalina” (Esquema 3) sendo que a transição entre essas duas fases ocorre apenas em determinadas temperaturas. Membranas lipídicas na fase l_d são altamente fluidas e suas moléculas de lipídeos tem alta mobilidade rotacional e lateral. Já na fase semi-sólida, os lipídeos estão altamente empacotados e não apresentam mobilidade ao longo da membrana.

Apesar de muitos trabalhos visando separar essas fases, ainda persiste uma

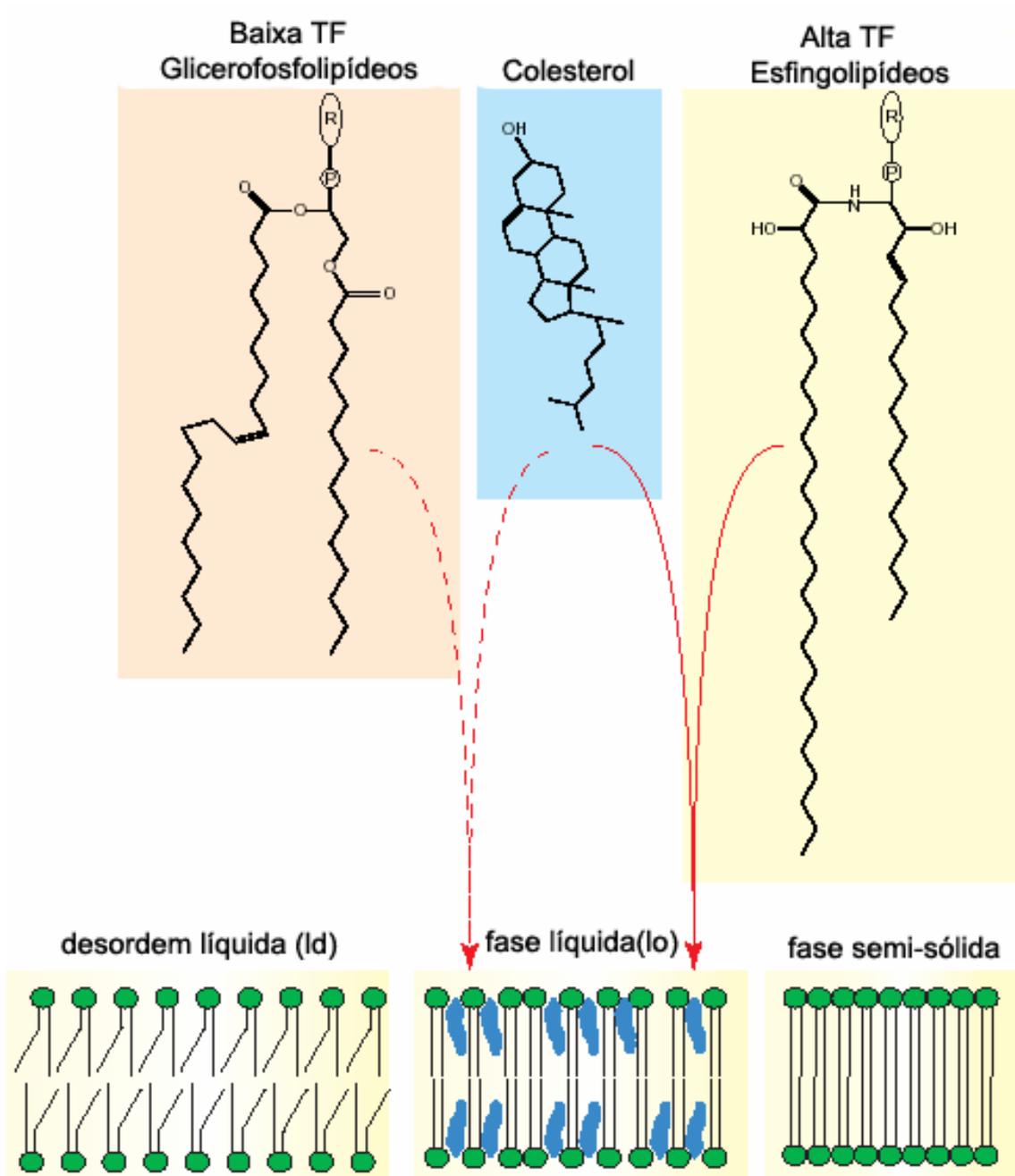


FIGURA 4: Estrutura dos lipídeos e as fases da membrana (retirado e adaptado de Mañes; Martinez -A, 2004).

fosfatidilinositol (4,5) bifosfato [PtdIns (4,5)P₂] e requer propriedades específicas da membrana para controlar essas muitas interações entre proteínas e lipídeos que será necessário para formação da rede de F-actina (Mañes; Martinez-A, 2004) (Esquema 4). A geração de PtdIns (4,5)P₂ depende do nível de colesterol na membrana plasmática (revisto em Mañes e col, 2003) e que outra GTPase reguladora, a Rac-1, se ligue preferencialmente em regiões enriquecidas com colesterol na membrana (del Pozo *et al*, 2004). Dessa forma, evidências sugerem a existência de pontos de ligação entre a polimerização de filamentos de actina na extremidade de células em movimento e a ligação desses domínios ricos em colesterol nessa mesma região.

Os resultados de VasANJI *et al* (2004) ajudam a entender os efeitos da capacidade bifásica do colesterol se comportar em membranas celulares durante a migração (Ghosh *et al*, 2002) e pode também ajudar a explicar as protusões vistas em células depletadas de colesterol e estimuladas com fatores de crescimento angiogênicos (Mañes e col, 1999). O modelo proposto por VasANJI *et al*, (2004) postula que o colesterol não afeta a maquinaria de polimerização, mas estabiliza a rede de F-actina através do aumento da resistência de membrana na região apical das células.

Além da modulação do citoesqueleto de actina, as plataformas de membrana também foram identificadas como capazes de modular a atividade de microtúbulos. Head *et al*, (2006) demonstraram que microtúbulos intactos e filamentos de actina são necessários para manter intacta a sinalização disparada por receptores de superfícies ligados à atividade da proteína G, uma vez que agentes despolimerizadores do citoesqueleto alteraram a distribuição de cavéolas, caveolina e a concentração de receptores nesses domínios, afetando a produção de AMP cíclico intracelular.

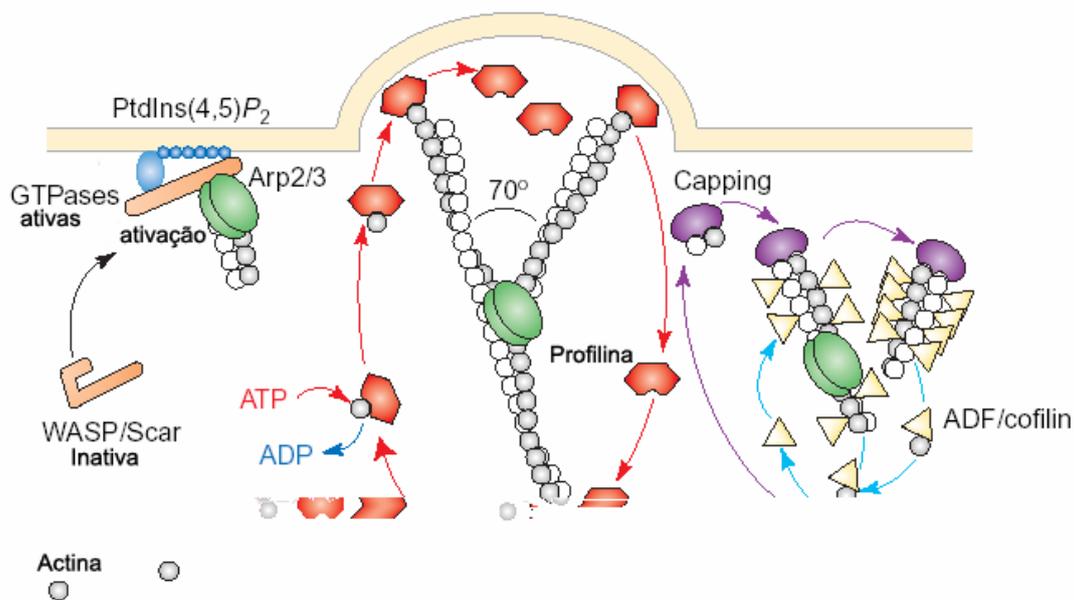


FIGURA 5: Polimerização de actina e a formação de protusões na borda de células em movimento (retirado e adaptado de Mañes e col, 2004).

1.11. Participação de plataformas de membrana na entrada de patógenos.

Uma vez capazes de interagir com o citoesqueleto, esses microdomínios também possuem uma capacidade endocítica ainda em fase de elucidação. Esses domínios parecem ter uma capacidade diferenciada, sendo capazes de mediar à entrada de patógenos como vírus e bactérias e até mesmo de parasitos maiores como protozoários. Células do trato urinário de camundongos (linhagem 5637 – ATCC) são facilmente invadidas por bactérias como *Escherichia coli*, que expressam uma estrutura de adesão chamada de fibrila tipo 1. Duncan *et al* (2004) demonstraram que bactérias dessa espécie são altamente patogênicas e capazes de invadir estas células através de uma estrutura tipo cavéola, já que a proteína caveolina 1 quando desativada através da técnica de RNAi causa uma redução na invasão de *E.coli*.

Plataformas de membrana parecem ser sítios preferenciais de entrada de patógenos e/ou suas toxinas. van der Goot e Harder, (2001) demonstraram que a entrada de cepas de *E.coli* que expressam a lectina FimH é mediada por domínios ricos em

colesterol. FimH se liga a proteína CD48 via GPI e dispara o mecanismo de internalização da bactéria que se localiza em um vacúolo justo contendo caveolina-1 e CD48. Além da *E.coli*, outras bactérias e toxinas também optam pela entrada na célula via esses microdomínios. Recentemente foi demonstrado que micobactérias invadem macrófagos através de domínios ricos em colesterol e que a depleção de colesterol inibe a internalização do microorganismo (Gatfield; Pieters, 2000).

Plasmodium falciparum, durante o estágio sanguíneo da infecção, é capaz de invadir eritrócitos maduros e jovens e se desenvolver confinado em um vacúolo parasitóforo. Micrografias eletrônicas mostram que o vacúolo nascente do plasmódio é formado por uma invaginação da membrana do eritrócito (Bannister; Mitchell, 1989) e que exclui proteínas de membrana do eritrócito, que são células anucleadas sem organelas e sem maquinaria de endocitose associada à sua membrana plasmática. Hiller *et al* (2003) demonstraram que o genoma de *P.falciparum* não codifica para caveolina 1 ou flotina, proteínas responsáveis por formações do tipo cavéola, mas contém uma proteína tipo estomatina 7 de humanos, conhecida pela capacidade de oligomerizar proteínas do tipo flotina. Esses resultados sugerem que róprias de parasitas do Filo Apicomplexa podem conter proteínas formadoras de rafts, induzindo assim a formação de domínios tipo cavéola na membrana do eritrócito, facilitando assim a invasão.

1.12. Alterações no colesterol de plataformas de membrana – efeito na interação parasito-célula hospedeira.

Com o envolvimento de plataformas de membrana na entrada de patógenos como vírus, bactérias e protozoários (Fantini *et al*, 2002; Lafont; van der Goot, 2005; Pucadyil *et al*, 2004; Rodríguez; Gaur; Wilson, 2006) surgiu a necessidade de entender melhor esse processo e tentar bloqueá-lo de alguma maneira. . Além da *E. coli* (van der

Goot; Harder, 2001) outras bactérias e/ou toxinas também usam esses domínios para entrar na célula. Recentemente foi demonstrado que *Mycobacterium* invade macrófagos através de plataformas de membrana, uma vez que a depleção de colesterol bloqueia a invasão (Gatfield; Pieters, 2000).

Na tentativa de bloquear a entrada via plataformas de membrana, o agente mais comumente usado para depletar colesterol de membranas e, conseqüentemente desorganizar as plataformas de membrana, é a metil β -ciclodextrina (MBCD). Ciclodextrinas são oligosacarídeos com 6, 7 ou 8 unidades de glicopiranosose, geralmente chamadas de α , β e γ -ciclodextrina, respectivamente. Essas ciclodextrinas têm a capacidade de seqüestrar lipídeos de um conjunto hidrofóbico, incorporando a molécula lipídica no interior de sua estrutura, no local ocupado por moléculas de água (Pitha *et al*, 1988; Rodal *et al*, 1999) (Esquema 5). Tem sido demonstrado que ciclodextrinas retiram o colesterol de membranas além de reduzir processos endocíticos dependentes de cavéola. Metil β -ciclodextrina é um heptassacarídeo cíclico solúvel em água que se liga a colesterol com alta afinidade (Pitha *et al*, 1988). Colesterol de membranas plasmáticas de células em cultura é rapidamente removido em resposta ao tratamento com MBCD (Klein; Gimpl; Fahrenholz, 1995; Kilsdonk *et al*, 1995), dessa forma sendo exaustivamente usada como agente depletor de colesterol por sua maior afinidade e eficiência quando comparada a outras ciclodextrinas (Klein; Gimpl; Fahrenholz, 1995). Estudos recentes também indicam que a depleção de colesterol pela MBCD desorganiza plataformas de membrana (Hooper, 1999; Ostermeyer *et al*, 1999) e afeta várias vias de sinalização disparadas a partir da superfície celular (Kabouridis *et al*, 2000; Parpal *et al*, 2001).

Patógenos como *Streptococcus sp* tem a invasão por cavéolas reduzida após o tratamento com MBCD (Rohde *et al*, 2003) assim como a *Escherichia coli* tipo I

(Duncan *et al*, 2004; Zaas *et al*, 2005). Por outro lado, a adesão de *Chlamydia trachomatis* e sua posterior entrada em células HeLa não são afetadas após o tratamento com MBCD (Gabel *et al*, 2004). Entre patógenos de maior interesse para este estudo, apenas as espécies de *Leishmania* foram testadas. No caso de *Leishmania donovani* (Pucadyil *et al*, 2004) e *Leishmania chagasi* (Rodríguez; Gaur; Wilson, 2006) estudos recentes mostram que a depleção de colesterol em macrófagos via MBCD afeta a capacidade de aderir e invadir do parasita.

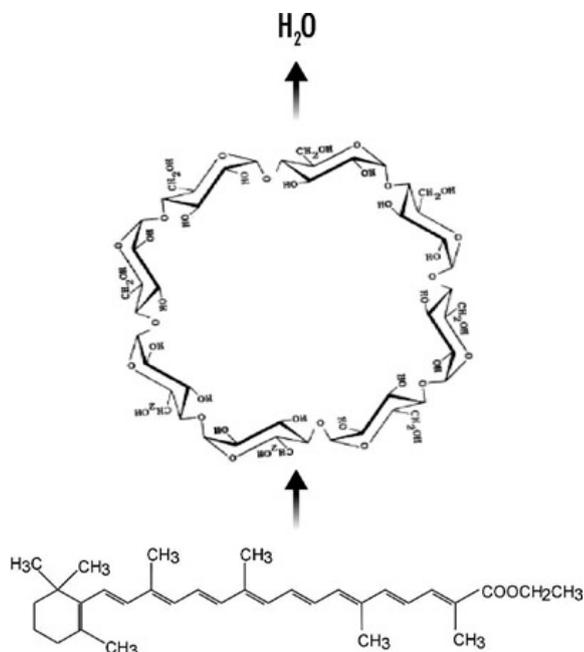
Outra via de entrada afetada pelo tratamento com MBCD é a via de entrada por cavéolas. No caso do *Plasmodium falciparum* foi demonstrado a ausência de seqüência para caveolina-1 ou flotina – proteínas conhecidas por residirem em cavéolas, mas foi identificado um gene codificante para uma proteína similar a estomatina-7 de humanos, cuja função é agregar proteínas como a flotina e induzir a formação de cavéolas na membrana plasmática. Essas cavéolas apareceram na membrana de eritrócitos infectados e parecem facilitar a entrada do plasmódio (Hiller *et al*, 2003).

1.13. Flotinas e caveolinas – proteínas de plataformas de membrana.

Algumas proteínas integrais de membrana vêm sendo identificadas como associadas às plataformas de membrana. Essas proteínas podem ser do tipo transmembrana ou do tipo ancorada à membrana, como a caveolina. Caveolina é uma proteína oligomérica que se liga a moléculas de colesterol e induz a formação de um tipo especial de plataformas de membrana – as cavéolas.

Como outras proteínas associadas às plataformas de membrana, a caveolina mostra resistência à extração por detergentes aniônicos e aparece em perfis superiores em um gradiente de sacarose, sendo que essas características são perdidas quando a célula tem o colesterol extraído (Kurzchalia *et al*, 1992; Sargiacomo *et al*, 1993).

(A)



(B)

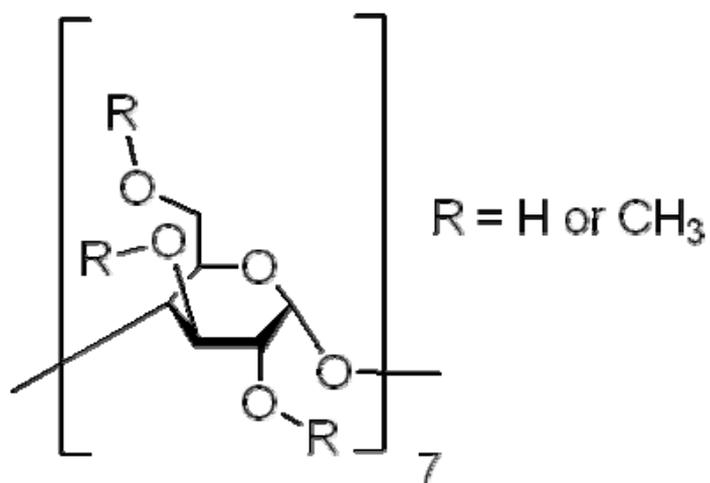


FIGURA 6: Estrutura de ciclodextrinas (A) mostrando o sítio de ligação de lipídeos, gerando a saída de uma molécula de água. Metil β-ciclodextrina (B). Fonte: Sigma Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>).

A caveolina não apresenta uma porção extracelular e parece formar uma estrutura em “U”, com ambas as porções C e N-terminal voltadas para o citoplasma (Dupree *et al*, 1993; Monier *et al*, 1995). A associação de caveolina com membranas é facilitada por uma região central, ácida e hidrofóbica, contendo 33 aminoácidos e delimitada por resíduos de aminoácidos carregados (Glenney; Soppet, 1992; Parton, 1996). Além disso, a caveolina tem três resíduos de cisteínas que sofrem palmitoilação próximo ao domínio de ligação à membrana, mas que não são responsáveis pelo endereçamento da proteína para plataformas de membrana (Dietzen; Hasting; Lublin, 1995).

Caveolina 1 é expressa em duas isoformas, a caveolina 1 α e a caveolina 1 β sendo que as isoformas α e β diferem pela posição da metionina inicial nas posições 1 e 32, respectivamente (Scherer *et al*, 1995). As duas isoformas parecem sobrepor-se funcionalmente mas apresentam uma pequena diferença quanto à distribuição em vários tipos de células de mamíferos (Scherer *et al*, 1995), além de induzirem a formação homogênea de vesículas em células de insetos (Li; Couet; Lisanti, 1996).

Atualmente estudos mostram que as isoformas α e β tem potenciais diferentes na indução de cavéolas e que a composição molecular dessa estrutura é muito variável, sugerindo inclusive que isso mude a profundidade da cavéola (Fujimoto *et al*, 2000) entretanto, pouco ainda se sabe sobre a real participação de caveolina na formação e manutenção de cavéolas.

Outra proteína identificada em plataformas de membrana é a flotina. Flotina-1 ou reggie-2, como era originalmente chamada, foi identificada durante a busca por proteínas envolvidas na regeneração neuronal de peixe-dourado (Schulte *et al*, 1997). No caso de peixes, flotina-1 é chamada de reggie-2 e flotina -2 de reggie – 1, ou seja, nomenclatura derivada do inglês *regeneration*.

A nomenclatura flotina surgiu para células de mamíferos a partir da resistência dessa proteína à extração por detergentes e da sua capacidade de permanecer na fase superior de um gradiente de sacarose (do inglês *floating*) (Bickel *et al*, 1997). Flotinas 1 e 2 de camundongos mostram 47% de identidade e 68% de similaridade e ainda não foram descritos outros membros dessa família apesar de 4 genes distintos para flotina terem sido achados em *zebrafish* e *goldfish*, correspondente a duplicação dos genes para flotina 1 e 2 (Malaga-Trillo *et al*, 2002).

O c-DNA de flotina -1 de camundongos codifica uma proteína de 428 aminoácidos com um peso molecular de, aproximadamente, 47 kDa onde , a partir da seqüência primária, a porção N-terminal contém dois sítios hidrofóbicos para associação à membrana; enquanto a porção C-terminal contém uma região em alfa-hélice possivelmente envolvida na interação da flotina com outras proteínas (Bickel *et al*, 1997).

Em mamíferos, a flotina-1 foi identificada em células do sistema nervoso, tecido adiposo, músculos e eritrócitos (Volonte *et al*, 1999). Mesmo não tendo sido caracterizada em macrófagos logo no início, uma análise proteômica de fagossomos isolados de macrófagos J774 mostrou a presença de mais de 140 proteínas fagossomais, incluindo a flotina-1 (Garin *et al*, 2001). Esse estudo também confirmou a presença de flotina-1 na membrana de fagossomos carregados com partículas fluorescentes de látex.

No caso de fagocitose associada a plataformas de membrana, flotina-1 foi identificada associada à um número maior de fagossomos contendo uma cepa de *Leishmania* deficiente na produção de LPG do que em fagossomos contendo cepas normais (Dermine *et al*, 2001), sugerindo que a âncora de GPI da molécula de LPG seja capaz de interagir e endereçar a flotina-1 para plataformas de membrana (Dermine *et*

al, 2000; 2001). A presença de flotina-1 na membrana de fagossomos maduros juntamente com os resultados que mostram sua ausência em fagossomos impedidos de maturar, seja pela ação de bafilomicina A1 ou pela infecção com cepas LPG-positivas de *Leishmania*, sugerem uma função importante para flotina-1 no processo de maturação de fagossomos para fagolissosomos (Dermine *et al*, 2001).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Diante da possibilidade de invasão dependente de plataformas de membrana e de uma sinalização específica disparada via lipídeos por outros patógenos, este estudo tem por finalidade identificar uma possível participação de estruturas como plataformas de membrana na entrada do *Trypanosoma cruzi* na célula hospedeira. Além de analisar a participação desses domínios de membrana, este estudo também irá analisar a participação da paxilina e a interação dessa proteína com microfilamentos de actina, na tentativa de elucidar um dos vários mecanismos de entrada do parasita na célula hospedeira.

2.2. Objetivo Específicos

- 2.2.1 Analisar a participação da paxilina no processo de entrada de tripomastigotas de *T.cruzi* em macrófagos peritoniais, células epiteliais da linhagem LLC-MK₂ e fibroblastos knock-out para paxilina;
- 2.2.2 Analisar, por microscopia confocal a laser, os eventos de fosforilação em tirosina promovidos pela adesão do parasita na célula hospedeira, no caso, macrófagos peritoniais de camundongos e células epiteliais LLC-MK₂ e a relação dessa fosforilação com a atuação da paxilina;
- 2.2.3 Observar o comportamento de células knock-out para paxilina diante da invasão de tripomastigotas de *T.cruzi*, quantificando índices de adesão e internalização nesse tipo celular;
- 2.2.4 Identificar a possível participação de plataformas de membrana na entrada das três formas evolutivas de *T.cruzi* em macrófagos;
- 2.2.5 Estudar o efeito de agentes depletors de colesterol como a metil β -ciclodextrina e a filipina sobre macrófagos e células epiteliais infectadas;
- 2.2.6 Caracterizar as alterações morfológicas induzidas pela ação dessas drogas em macrófagos infectados;
- 2.2.7 Identificar e quantificar o processo de morte celular programada disparado após a adesão do parasita à superfície de macrófagos tratados com metil β -ciclodextrina.

3. Materiais & Métodos

3.1 Parasitas

Utilizamos nesse trabalho epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, isolada em um caso agudo de doença de Chagas (Silva; Nussenzweig, 1953), mantidos e obtidos *in vitro* conforme descrito no item 3.2.

3.2 Culturas de células normais e parasitadas

3.2.1 Manutenção e obtenção de tripomastigotas da cepa Y.

Para a manutenção da cepa Y *in vitro*, usamos a linhagem LLC-MK₂ (ATCC) cultivada em meio RPMI (Gibco), suplementado de 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As culturas foram mantidas em garrafas de 25cm³ (TPP), a 37⁰C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a confluência da cultura, as células foram removidas com auxílio de Tripsina-Verseno (0,2 e 0,02% respectivamente) e semeadas em novas garrafas na faixa de 10⁵ células por garrafa. Essas células foram infectadas com formas tripomastigotas sanguíneas de *T.cruzi* (cepa Y), obtidas de camundongos suíços previamente infectados. De cinco a sete dias após infecção, formas tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante da cultura, usadas para manter o ciclo *in vitro* e também para ensaios.

3.2.2 Manutenção de epimastigotas da cepa Y.

Epimastigotas da cepa Y foram obtidos através do cultivo monoaxênico em meio LIT (Camargo, 1964), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas a 28°C durante quatro a cinco dias, ou seja, até atingirem a fase LOG de crescimento. Todos os ensaios foram feitos utilizando epimastigotas com quatro dias de cultivo.

3.2.3 Macrófagos peritoniais.

Para os experimentos de interação foram utilizados macrófagos peritoniais retirados por lavagem do peritônio de camundongos suíços com cerca de cinco semanas. O lavado do peritônio foi feito através da injeção de meio RPMI gelado, recolhimento do conteúdo injetado para posterior lavagem. Esse lavado contendo macrófagos foi centrifugado durante 15 minutos a 2000 rpm, ressuspensão por duas vezes em meio RPMI e plaqueado no mesmo meio agora contendo 10% de soro fetal bovino.

Após uma hora aderindo a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, a cultura foi lavada para retirar as células não aderidas, permitindo que apenas macrófagos se mantenham em cultura para a realização dos ensaios.

3.2.4 Fibroblastos T-17.

1.1.1.1 Células T-17 (-/- e CPax) são derivadas de células tronco de camundongos com gene para paxilina deletado, crescidas sob a pele de camundongos atímicos (Wade; Vande Pol, 2006). A linhagem T-17 -/- não expressa a paxilina, mas pode vir a expressar Hic-5 e carrega o plasmídeo pBABE puro como controle para o processo de transfecção que foi usado para gerar a linhagem CPax (Mapa proposto por Morgenstern; Land, 1990). Células T-17 CPax tem uma seqüência de paxilina de embrião de galinha clonado nesse plasmídeo pBABE puro. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio M199(Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37^o C em uma atmosfera de 5% CO₂. As culturas não necessitam de

controle de expressão pelo uso de antibióticos como puromicina ou G418 (geneticina), mas são resistentes a ambos.

3.3 Microscopia óptica.

3.3.1 Determinação dos índices de adesão, internalização e infecção por microscopia óptica de campo claro.

Para avaliar as alterações nos índices de adesão, internalização e sobrevivência de epimastigotas e tripomastigotas em relação aos vários tipos celulares testados, estabelecemos que as células hospedeiras foram plaqueadas sempre na ordem de grandeza de 10^4 , em placas de 24 poços (TPP) contendo lamínulas redondas de 13mm (Corning) de diâmetro no fundo de cada poço, sempre 24 horas antes de cada ensaio. Após o tratamento (ou não) com as drogas em questão, as células foram colocadas para interagir com epimastigotas ou tripomastigotas na proporção de 10 parasitas: célula, em meio RPMI sem soro fetal bovino, durante uma hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Após a interação, as células foram lavadas para retirar os parasitas que não aderiram, fixadas com formalina 10% em PBS e coradas com GIEMSA® (10:1 em água destilada) (Merck). Para observação em microscopia de campo claro as células precisam passar por uma bateria de desidratação de acetona – xilol (acetona 100%, acetona – xilol 70 – 30 %, 50 % e 30 – 70 %) antes de serem fixadas em lâminas com Entellan®(Merck).

Para analisar os índices de adesão, internalização e infecção, usaremos as fórmulas abaixo:

- **Índice de adesão** = (número de células com parasitas aderidos x 100/número de células totais) x (número de parasitas aderidos/ número de células com parasitas aderidos).
- **Índice endocítico** = (número de células com parasitas internalizados x 100/número de células totais) x (número de parasitas intracelulares/ número de células com parasitas intracelulares).
- **Índice de infecção** = (número de células com parasitas internalizados x 100/número de células totais) x (número de parasitas intracelulares/ número de células com parasitas intracelulares). Nesse caso são considerados as formas tripomastigotas e amastigotas.
- **Teste Estatístico:** Teste *T* de Student com $p \leq 0,05$.

3.3.2 Determinação dos índices de adesão, internalização e sobrevivência em macrófagos, LLC-MK₂ e fibroblastos T-17.

Para avaliar a capacidade de aderir, invadir e sobreviver no interior de macrófagos, células LLC-MK₂ e fibroblastos T-17 foram plaqueadas, infectadas e coradas conforme descrito no item III A.

Cada experimento foi feito em triplicata e foram contadas 500 células em cada lâmina. A média dos três experimentos foi calculada e aplicada nas fórmulas acima descritas. Os resultados foram avaliados segundo o intervalo de confiança de $p \leq 0,05$ do teste estatístico escolhido.

3.3.3 Determinação dos índices de adesão, internalização e infecção de epimastigotas e tripomastigotas em células pré-tratadas com metil β -ciclodextrina.

Macrófagos e células LLC-MK₂ foram preparadas conforme descrito no item 3.3.1. Antes da infecção as células foram tratadas com 5, 10 e 20 mM de metil β-ciclodextrina (SIGMA) em meio RPMI sem soro fetal bovino durante 30 minutos, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o tratamento as células foram lavadas para remover a droga e colocadas para interagir com epimastigotas ou tripomastigotas conforme o item 3.3.1. Os índices também foram calculados usando as fórmulas acima descritas, em um total de três experimentos.

Para determinar a capacidade de infecção e sobrevivência de tripomastigotas em células pré-tratadas com metil β-ciclodextrina, macrófagos e células LLC-MK₂ foram pré-tratadas com as mesmas concentrações de metil β-ciclodextrina durante 30 minutos e lavadas com RPMI sem soro para retirar toda droga. Para repor o colesterol removido com a ação da metil β-ciclodextrina, as culturas foram colocadas por duas horas em meio RPMI com 20% de soro fetal bovino, a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Somente após essas duas horas o meio foi trocado para uma concentração de 10% de soro fetal bovino antes da interação com tripomastigotas.

A interação, em meio RPMI sem soro fetal bovino, foi feita por uma hora a 37°C e, após esse tempo, as células foram lavadas para retirar os parasitas que não aderiram e mantidas por 24, 48, 72 e 96 horas seguintes. O primeiro tempo foi recolhido 24 horas após a interação, fixado e corado conforme descrito no item 3.3.1. Os demais tempos foram processados da mesma maneira e analisados por microscopia óptica de campo claro. Cada tempo foi feito em duplicata e foram contadas 250 células por lâmina. A média de cada tempo foi aplicada na fórmula para determinar o índice de infecção

3.3.4 Determinação dos índices de adesão e internalização de tripomastigotas em células pré-tratadas com filipina.

Macrófagos e células LLC-MK₂ foram preparadas conforme descrito no item 3.3.1. Antes da infecção as células foram tratadas com 1, 3 e 6 mM de filipina III (SIGMA) em meio RPMI sem soro fetal bovino durante 30 minutos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o tratamento as células foram lavadas para remover a filipina e colocadas para interagir com tripomastigotas conforme o item 3.3.1. Os índices também foram calculados usando as fórmulas acima descritas, em um total de três experimentos.

3.4 Microscopia óptica de fluorescência

Para ensaios de imunofluorescência, os tipos celulares usados foram plaqueados conforme descrito no item 3.3.1 e colocados para interagir com tripomastigotas de *T.cruzi*. Após uma hora de interação, as células foram lavadas com tampão PHEM 0,1 M (50 mM cloreto de magnésio, 70 mM cloreto de potássio, 10 mM EGTA, 20 mM HEPES, 60 mM PIPES pH 7,2), fixadas durante uma hora com paraformaldeído 4% no mesmo tampão, permeabilizadas com acetona P.A durante 10 minutos à -20⁰C e re-hidratadas com o PBS pH 8,0 contendo 3% de albumina bovina (SIGMA). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com tampão de bloqueio contendo 3% de albumina bovina, 0,02% de Tween 20 em PBS pH 8, 0, durante uma hora e 30 minutos, com trocas a cada 30 minutos.

Após a incubação com os anticorpos de interesse, as células foram lavadas em PBS pH 7.2 e montadas sobre lâminas contendo 0,2 N de N - propil galato (SIGMA) em

glicerol 90% em PBS, vedadas com esmalte e observadas no microscópio confocal a laser Zeiss LSM 300 e no microscópio Axioplan (Carl Zeiss).

3.4.1 Detecção de proteínas fosforiladas em tirosina, paxilina e microfilamentos de actina

Para detecção de proteínas fosforiladas em tirosina e de paxilina, as células foram preparadas conforme descrito acima e incubadas com anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina (Clone 4G10 - Molecular Probes) diluído 1:100 em tampão de bloqueio durante uma hora. Após a incubação as células foram lavadas e incubadas com anticorpo policlonal anti-paxilina (Santa Cruz) diluído 1:100 em tampão de bloqueio por uma hora. Para visualiza os anticorpos anti-fosfotirosina e anti-paxilina, as células foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a fluorocromos ALEXA-488 e ALEXA -546 (Molecular Probes).

Para detecção de filamentos de actina, as células foram incubadas com faloidina – rodamina (1:40 em PBS) (Molecular Probes) por 30 minutos, lavadas em PBS pH 7.2. Todas as amostras foram incubadas com DAPI para facilitar a localização de tripomastigotas.

3.4.2 Localização de plataformas de membrana – Marcação com a subunidade B da toxina do cólera ligado a fluoresceína.

Para visualização do gangliosídeo GM1, as células foram plaqueadas conforme descrito no item 3.3.1. A toxina do cólera (FITC-CTx) (Sigma) foi diluída em meio RPMI sem soro fetal bovino em uma concentração final de 10 µg/ml, colocada no meio de cultura para entrar em contato com as células durante 30 minutos a 4°C. Após esse tempo as células foram lavadas para retirar a toxina excedente, colocadas para

interagir com formas tripomastigotas por 30 minutos ainda a 4°C. Parte das amostras foi fixada com 4% de formaldeído em PBS pH 7,2 enquanto outra parte foi colocada a 37°C por 15, 30 e 45 minutos além dos primeiros 30 minutos de interação a 4°C. Essas amostras também foram fixadas como descrito acima e observadas no microscópio de fluorescência Axioplan (Carl Zeiss).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura.

3.5.1 Microscopia eletrônica de varredura após o tratamento com metil β -ciclodextrina

Para observação da morfologia das células após o tratamento com metil β -ciclodextrina e durante o processo de invasão do parasita, as células foram plaqueadas sobre lamínulas redondas de 13 mm de espessura colocadas em uma placa de 24 poços (TPP), 24 horas antes da interação com tripomastigotas de *T. cruzi*. Após esse tempo, as células foram tratadas com 20mM de metil β -ciclodextrina por 30 minutos a 37°C, lavadas para retirar a droga e colocadas para interagir com tripomastigotas por 30 minutos. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas em PBS, fixadas com glutaraldeído grau II a 2,5%, formaldeído 4%, CaCl_2 (5mM) em tampão cacodilato de sódio 0,1M contendo 2% de sacarose por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de fixado, o material foi lavado duas vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M com 2% de sacarose, pH 7,2, e em seguida pós-fixado com tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8%, cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a pós-fixação, as células foram lavadas no tampão cacodilato e então desidratadas em concentrações crescentes de etanol de 30 até 100%. A secagem do material foi realizada pelo método do ponto

crítico (modelo CPD 30/ Baltec), e após a montagem em “stubs”, será realizada a metalização em ouro (FL 9496/ Balzers) para posterior observação no microscópio de varredura Jeol (JSM 5310).

3.6. Detecção de células em apoptose utilizando a técnica de TUNEL após o tratamento com metil β -ciclodextrina.

Para identificar o processo de apoptose nas células tratadas com metil β -ciclodextrina e infectadas com *T.cruzi*, utilizamos a técnica de TUNEL (Invitrogen). Para isso as células foram plaqueadas conforme descrito no item 3.3.1, tratadas com 20 mM de metil β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C, lavadas para remover a droga e colocadas para interagir com as três formas evolutivas do *T.cruzi* por mais 30 minutos, também a 37°C. Após a interação as células foram lavadas em PBS, fixadas com 1% de paraformaldeído em PBS gelado durante 15 minutos, novamente lavado em PBS e colocado em etanol 70% durante 30 minutos, no gelo.

Para marcação do DNA, as células foram incubadas no meio de reação contendo 10 μ L do tampão de reação, 0,75 μ L de TdT, 8 μ L de BrdUTP e 31,25 μ L de água deionizada, durante uma hora a 37°C. Após a incubação, as células foram lavadas com tampão de lavagem pertencente ao kit.

Para marcação com ALEXA-488 anti-BrdUTP, as células foram incubadas em uma solução 1:20 diluída do anticorpo em tampão de lavagem, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, 5 μ L de iodeto de propídio foi adicionado à diluição e incubado por mais 30 minutos. Todas as amostras foram lavadas no tampão de lavagem, montadas em 0,2 N de N-propil galato e observadas no microscópio de fluorescência Axioplan (Carl Zeiss).

3.7. Observação da exposição de fosfatidil serina utilizando citometria de fluxo em células tratadas com metil β -ciclodextrina.

Para detectar a exposição de fosfatidil-serina na superfície das células, as amostras foram incubadas com anexina V-FITC. Após serem plaqueadas, as células foram tratadas com 20 mM de metil β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C. Após o tratamento, as células foram lavadas para remover a droga e colocadas para interagir com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. Decorrida a interação, as células foram incubadas com anexina V-FITC (1 μ g/10⁵ células) e iodeto de propídeo (10 μ g/mL), diluído no mesmo tampão, durante uma hora à temperatura ambiente. Como controle, para a marcação, foram utilizados macrófagos que não foram incubados com os marcadores. As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (B-D Xcalibur) e analisadas com o auxílio do programa WinMDI 2.8 para computador.

3.8 Western Blotting.

Para confirmar a presença ou ausência de paxilina em macrófagos, LLC-MK₂, T-17 -/- e T-17 CPax, as células foram plaqueadas em placas de Petri (TPP) e mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂, 24 horas antes da interação com tripomastigotas de *T.cruzi*. Após uma hora de interação as células foram lavadas com PBS pH 7.2 e raspadas da garrafa em uma solução de 1% de inibidores de proteases (100 mM AEBSF, 1,5M de leupeptina, 80 μ M de aprotinina, 1,4 M de E64 e 4mM de bestatina). As amostras foram recolhidas no menor volume possível (100 μ L) e dosadas usando reagente de Bradford (Bradford, 1976).

Foram aplicadas 30 μ g de proteína diluída em tampão de amostra (Tampão Tris HCl 0,0625M pH 6,8 + SDS 2,5% + B-mercaptoetanol 5% + glicerol 7% + azul de bromofenol), colocada em água fervente durante 5 minutos e aplicadas em gel de SDS-PAGE (7,5% poliacrilamida). O perfil protéico foi então eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose, bloqueado com tampão de bloqueio (Tris-HCl 20mM pH 8, NaCl 0,9, leite desnatado 5% e Tween 20 0,01%), incubado com anti-paxilina, lavado em TBS-Tween (Tris-HCl 20mM pH8 + NaCl 0,9% + Tween 20 0,01%) e revelado por ECL (Amersham).

1. Resultados

4.1. Determinação dos índices de adesão, internalização e infecção de tripomastigotas de *T. cruzi* em vários tipos celulares.

Investigamos a capacidade do parasita em aderir, invadir e sobreviver no interior de células que expressam ou não paxilina, células como macrófagos, LLC-MK₂, fibroblastos T-17 ^{-/-} e T-17 CPax foram plaqueadas e infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* . Após uma hora de interação as células foram lavadas, fixadas e coradas para microscopia de campo claro. Após contagem, determinação dos índices de adesão e internalização e tratamento estatístico determinamos o perfil de cada tipo celular em questão (Figura 1). Os índices de adesão e internalização foram maiores em macrófagos, seguidos da linhagem LLC-MK₂. Já os fibroblastos T-17 mostraram um perfil similar ao da linhagem LLC-MK₂, principalmente o fenótipo T-17 CPax, onde a expressão da paxilina foi re-introduzida através de transfecção. Por ter um comportamento fagocítico profissional, os macrófagos mostraram a maior capacidade de internalização de tripomastigotas, resultado que corrobora com dados anteriores da literatura. Já a linhagem LLC-MK₂, tipicamente não - fagocítica profissional, teve o índice de internalização reduzido em quase 50% quando comparado ao índice de internalização visto em macrófagos. Esse resultado atinge a expectativa, uma vez que macrófagos e células epiteliais apresentam perfis fagocíticos bem distintos.

Já no caso da linhagem de fibroblastos T-17, encontramos índices de adesão e internalização similares ao padrão da linhagem LLC-MK₂. O fenótipo T-17 CPax, que apresenta o padrão normal de expressão de paxilina, mostrou índices muito similares ao da linhagem LLC-MK₂ apenas com uma pequena redução nos índices de adesão e internalização (7%). Entretanto, o fenótipo T-17 ^{-/-}, deficiente na expressão de paxilina, mostrou índices bem reduzidos quando comparados ao T-17 CPax e, quando comparado

a outras linhagens, mostrou os menores índices de adesão e internalização. Apesar dos fibroblastos T-17 serem células não fagocíticas profissionais, ficou claro que a ausência de paxilina reduz pela metade a capacidade de adesão e internalização dessas células, quando comparadas ao fenótipo CPax, e reduz cerca de três vezes se comparadas aos índices de macrófagos.

4.2. Determinação da capacidade de sobrevivência de tripomastigotas no interior de macrófagos, células LLC-MK₂ e fibroblastos T-17.

Avaliamos o comportamento das linhagens em questão após a invasão de tripomastigotas, acompanhando a fase intracelular do ciclo de vida do *T.cruzi* em todas as células. Após uma hora de interação com tripomastigotas, as células foram lavadas para retirar os parasitas que não aderiram e mantidas por 1, 24, 48, 72 e 96 horas em condições normais de cultivo. A cada 24 horas uma amostra era fixada e processada para microscopia óptica de campo claro. Com o cálculo do índice de sobrevivência, observamos que, assim como nos índices de adesão e internalização, os macrófagos oferecem o melhor ambiente para o sucesso da infecção, com as maiores taxas de multiplicação do parasita (Figura 2). Outra linhagem bem sucedida foi a LLC-MK₂, com índice de sobrevivência apenas um pouco menores que o índice apresentado por macrófagos. Quando comparamos os índices de sobrevivência do *T.cruzi* nos fibroblastos T-17 aos índices de LLC-MK₂, notamos que o fenótipo CPax apresentou um perfil muito similar ao da LLC-MK₂, assim como visto para os índices de adesão e internalização. Entretanto, o fenótipo -/- mostrou uma reduzida capacidade de suportar a infecção, com um pequeno número de parasitas intracelulares. Essa pequena proliferação pode ser resultado de uma pequena entrada, já que os índices de internalização também foram baixos (Figura 1), entretanto, esse fenótipo se mostrou

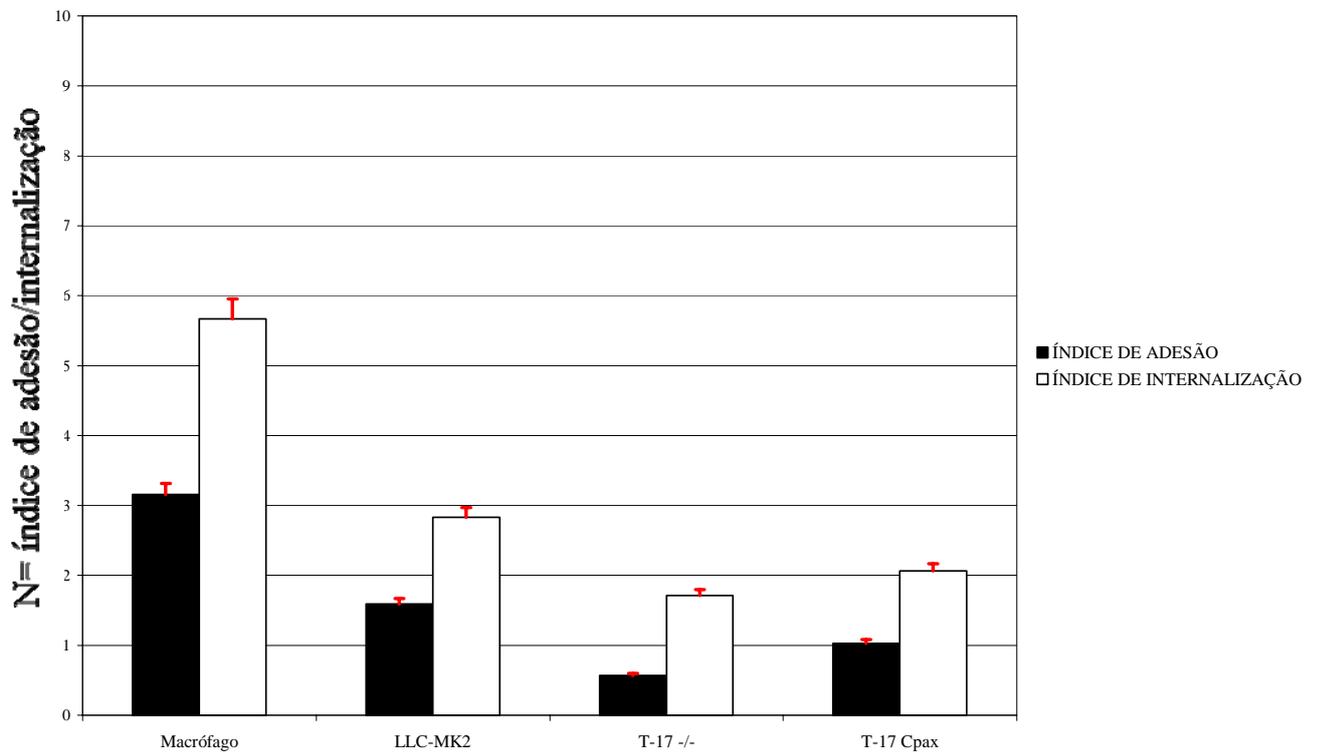


FIGURA 1: Histograma mostrando os índices de adesão (barras escuras) e os índices de internalização (barras claras) de macrófagos, células LLC-MK₂, fibroblastos T-17 -/- e T-17 CPax após uma hora de interação a 37°C com tripomastigotas de *T.cruzi*. Os índices foram calculados a partir da média de 3 experimentos e estatisticamente tratados pelo teste *T* de Student (com intervalo de confiança de $p \leq 0,05$)(barra vermelha).

Índice de adesão = (número de células com parasitas aderidos x 100/número de células totais) x (número de parasitas aderidos/ número de células com parasitas

Índice de internalização = (número de células com parasitas internalizados x 100/número de células totais) x (número de parasitas internalizados/ número de células com parasitas internalizados).

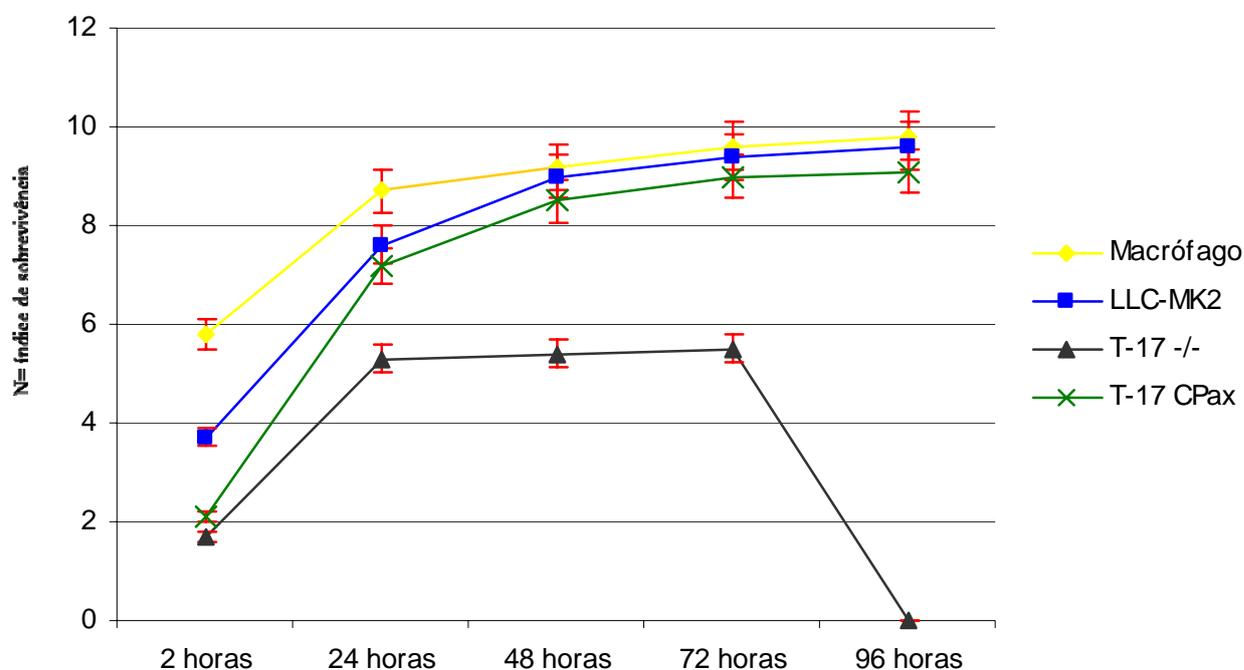


FIGURA 2: Gráfico mostrando o índice de infecção após 1, 24, 48, 72 e 96 horas de macrófagos, células LLC-MK₂, fibroblastos T-17 -/- e T-17 CPax infectados com tripomastigotas de *T.cruzi*. Os índices foram calculados a partir da média de 3 experimentos e estatisticamente tratados pelo teste *T* de Student (com intervalo de confiança de $p \leq 0,05$)(barra vermelha).

Índice de sobrevivência = (número de células com parasitas internalizados x 100/número de células totais) x (número de parasitas internalizados/ número de células com parasitas internalizados).

incapaz de sobreviver por mais 24 horas, ou seja, com 96 horas de infecção a cultura de T-17 -/- havia morrido enquanto as demais linhagens prosseguiram vivas e infectadas.

4.3. Localização da paxilina - relação entre eventos de fosforilação e concentração de actina durante a invasão do *T.cruzi*.

Para uma primeira análise da participação da paxilina nos eventos de adesão e internalização de tripomastigotas, células da linhagem LLCMK₂, macrófagos peritoniais e fibroblastos T-17 foram infectados com tripomastigotas de *T.cruzi* por uma hora e incubados com anti-paxilina seguido do anticorpo secundário fluorescente para observação em microscopia óptica de fluorescência. Observamos uma marcação concentrada do anti-paxilina no sítio de entrada do parasita em células LLC-MK₂ (Figura 3C) além de uma concentração de F-actina revelada após a incubação com faloidina-rodamina (Figura 3B). Quando as imagens são sobrepostas, identificamos uma co-localização das marcações, indicando que existe uma concentração de paxilina e de F-actina ao redor do sítio de entrada do parasita (Figura 3D). Quando a marcação foi feita em macrófagos infectados (Figura 4) podemos observar que também existe uma concentração de F-actina (Figura 4B) e de paxilina (Figura 4C) no sítio de entrada do parasita, mas não observamos uma co-localização das marcações (Figura 4D). Nesse caso, apenas existe uma co-localização em parte do corpo do parasita, enquanto a parte que parece não estar em contato com a membrana do macrófago mostrou apenas uma marcação para paxilina (Figura 4D – cabeça de seta). Já no caso dos fibroblastos T-17, esse padrão de marcação foi completamente alterado. Nas células de fenótipo T-17

Quando observamos a distribuição de paxilina, identificamos um padrão diferente do observado em macrófagos (Figura 3) e LLC-MK₂ (Figura 4), com uma distribuição homogênea por toda célula, ao contrário do visto nos dois tipos celulares anteriores, onde ficou claro uma concentração da paxilina mais forte nos pontos de adesão focal e ao redor de parasitas. No fenótipo CPax, a marcação da paxilina continua presente ao redor de parasitas em processo de internalização (Figura 5C - cabeça de seta), mas com uma intensidade reduzida quando comparado as imagens anteriores, e essa redução na concentração de paxilina também mostrou-se evidente quando as marcações foram sobrepostas (Figura 5D). Quando observamos a marcação para paxilina e F-actina nas células com fenótipo -/-, o padrão de distribuição tanto de F-actina quanto de paxilina muda drasticamente (Figura 6). Por ser uma célula diferenciada a partir de uma célula tronco com gene para paxilina deletado, o padrão de distribuição de filamentos de actina ficou completamente diferente do padrão visto nas outras células (Figura 6B), ou seja, nesse fenótipo os filamentos se apresentam mais curtos e incapazes de se prolongar por uma grande extensão da célula, além de não serem capazes de concentrar-se ao redor do sítio de entrada do parasita. Por não ter expressão de paxilina, não vimos nenhuma marcação nesse tipo celular (Figura 6C), nem mesmo quando essas amostras foram observadas com a ajuda de microscopia confocal a laser. Sem a marcação para paxilina, não houve sobreposição das duas imagens (Figura 6D). Conforme descrito por Vieira *et al*, (2002), eventos de fosforilação em tirosina precedem a entrada do parasita e recrutam F-actina para o sítio de entrada. Além disso, a paxilina é um dos seis peptídeos sugeridos como sítio dessa fosforilação em tirosina.

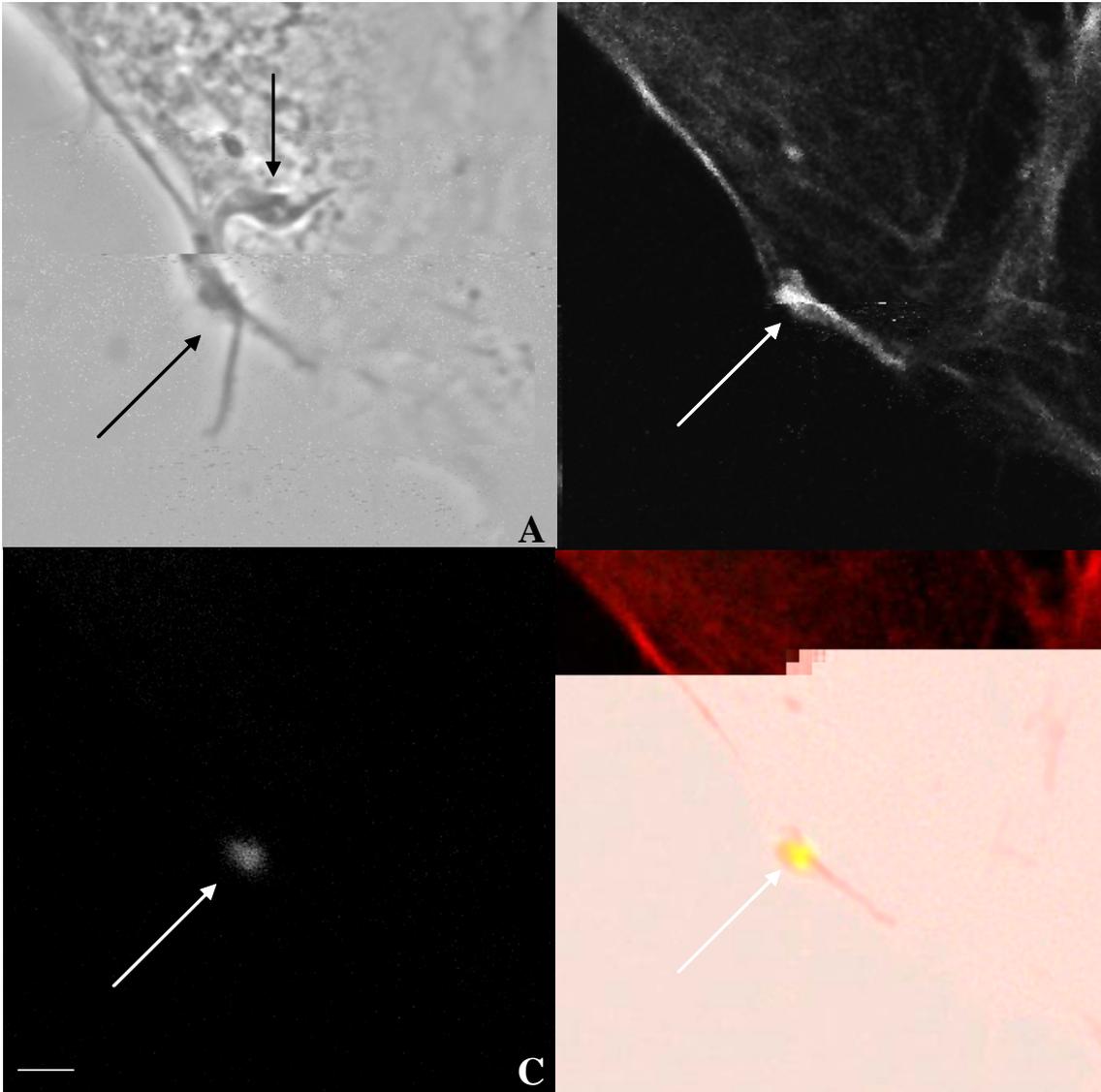


FIGURA 3: Microscopia confocal a laser de células LLC-MK₂ colocadas para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com faloidina – rodamina (1:40) por 30 minutos (B) e posteriormente incubadas com e anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio), seguido de anticorpo secundário ALEXA- 488 (1:400) (C). As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Podemos observar uma forma tripomastigota em processo de invasão (A - seta), com uma concentração de F-actina (B) e paxilina (C) no sítio de entrada. Ambas as marcações co-localizam, mostrando que existe um recrutamento de F-actina e paxilina no momento da invasão (D). Tripomastigota (seta); Barra = 5µm.

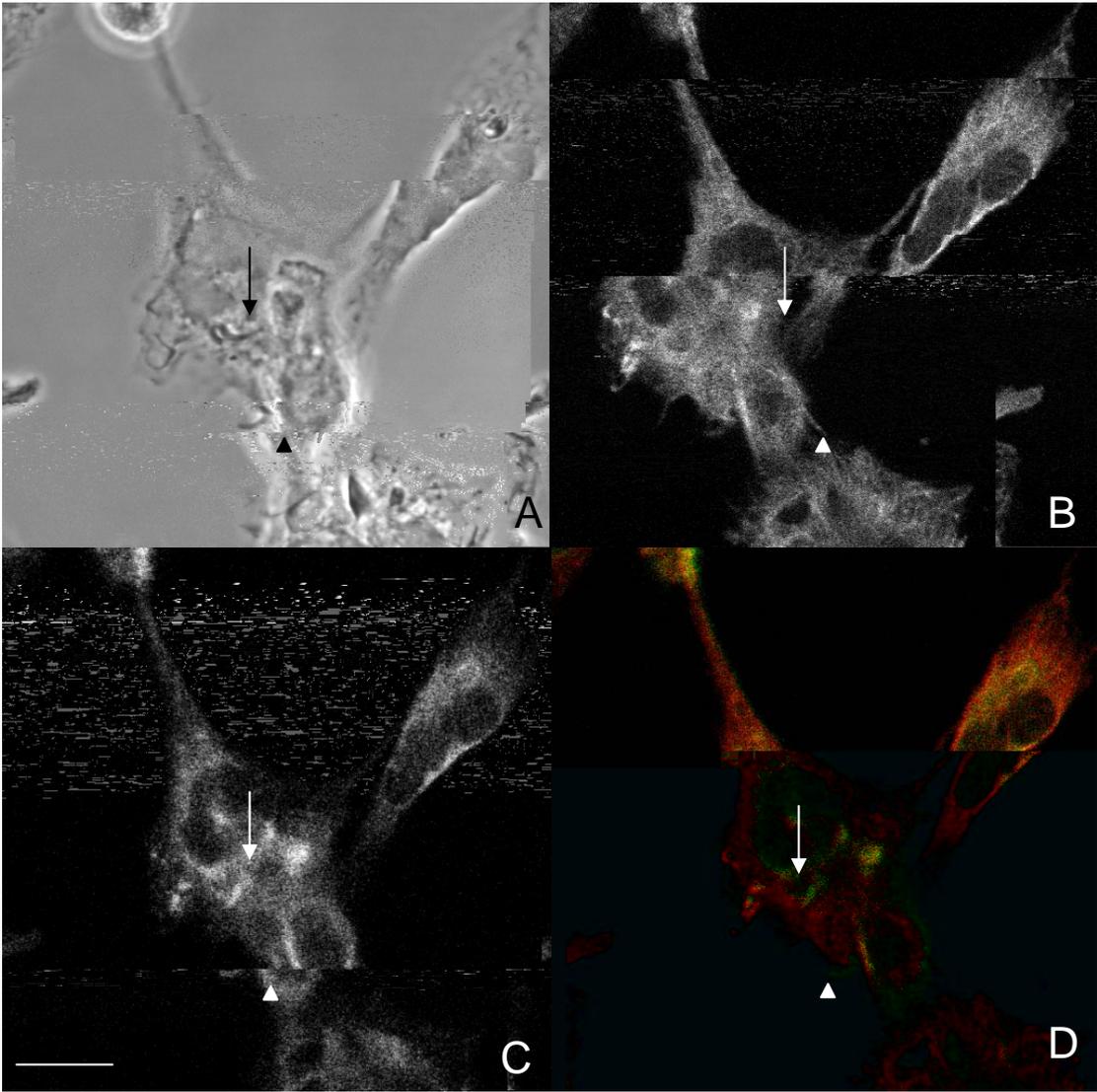


FIGURA 4: Microscopia confocal a laser de macrófagos colocados para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com faloidina – rodamina (1:40) por 30 minutos (B) e posteriormente incubadas com anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio), seguido de anticorpo secundário ALEXA- 488 (1:400) (C). As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Podemos observar duas formas tripomastigota em processo de invasão (A – seta e cabeça de seta), com uma concentração de F-actina (B) e paxilina (C) no sítio de entrada. As marcações não co-localizam no parasita que parece estar somente aderido (D-seta) enquanto existe uma co-localização apenas na parte do corpo do outro parasita que parece estar em processo de invasão (D - cabeça de seta). Tripomastigota aderido (seta); tripomastigota sendo internalizado (cabeça de seta). Barra = 10µm.

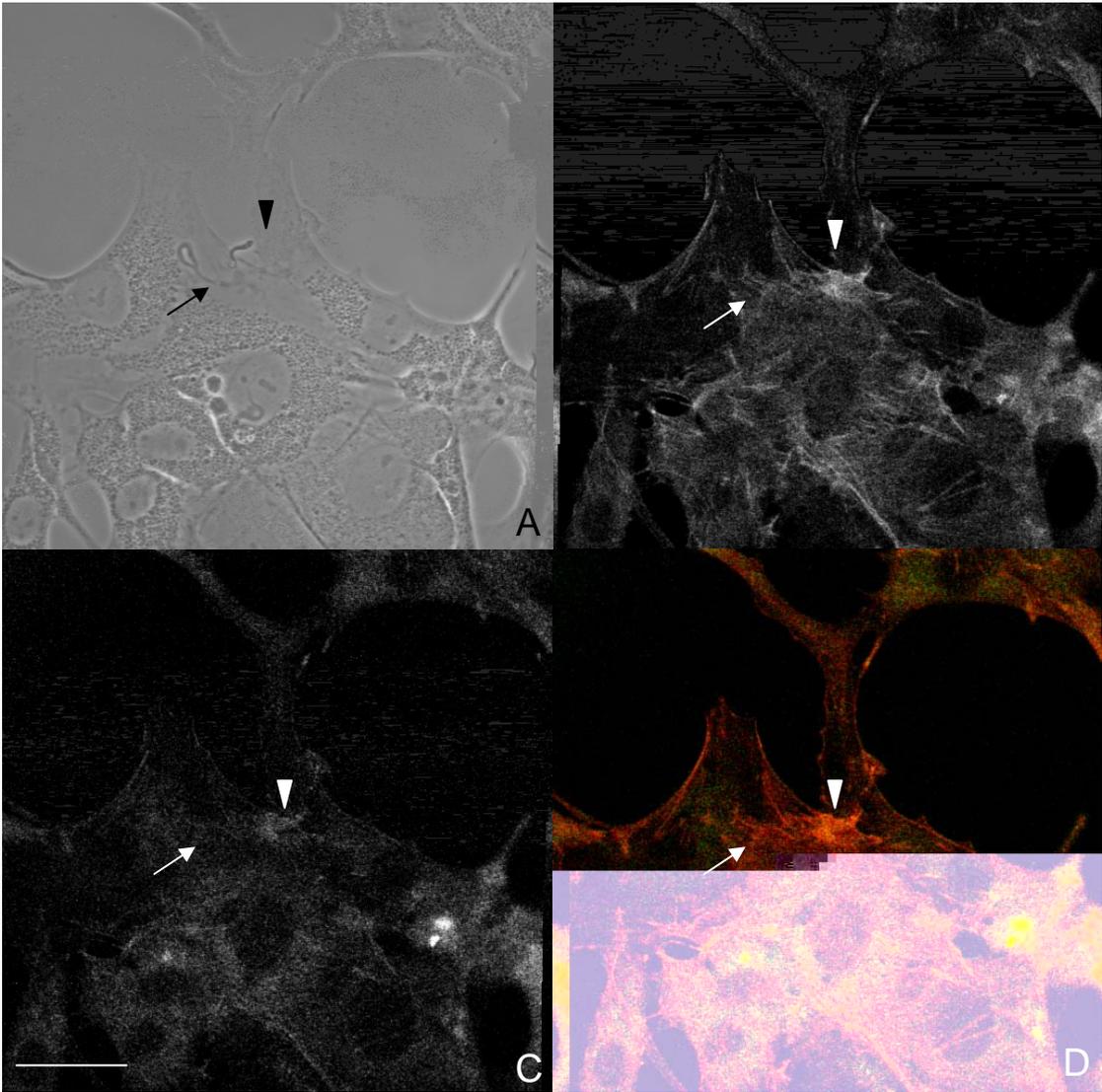


FIGURA 5: Microscopia confocal a laser de fibroblastos T-17 CPax colocados para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com faloidina – rodamina (1:40) por 30 minutos (B) e posteriormente incubadas com e anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio), seguido de anticorpo secundário ALEXA- 488 (1:400) (C). Notamos que o padrão de marcação para paxilina é diferente dos outros dois tipos celulares observados anteriormente (Figuras 3 e 4), mostrando uma redução na intensidade. Nesse caso observamos que existe concentração de F-actina (B) e paxilina (C) no parasita que está sendo internalizado (cabeça de seta). As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Tripomastigota (seta); Barra = 10 μ m.

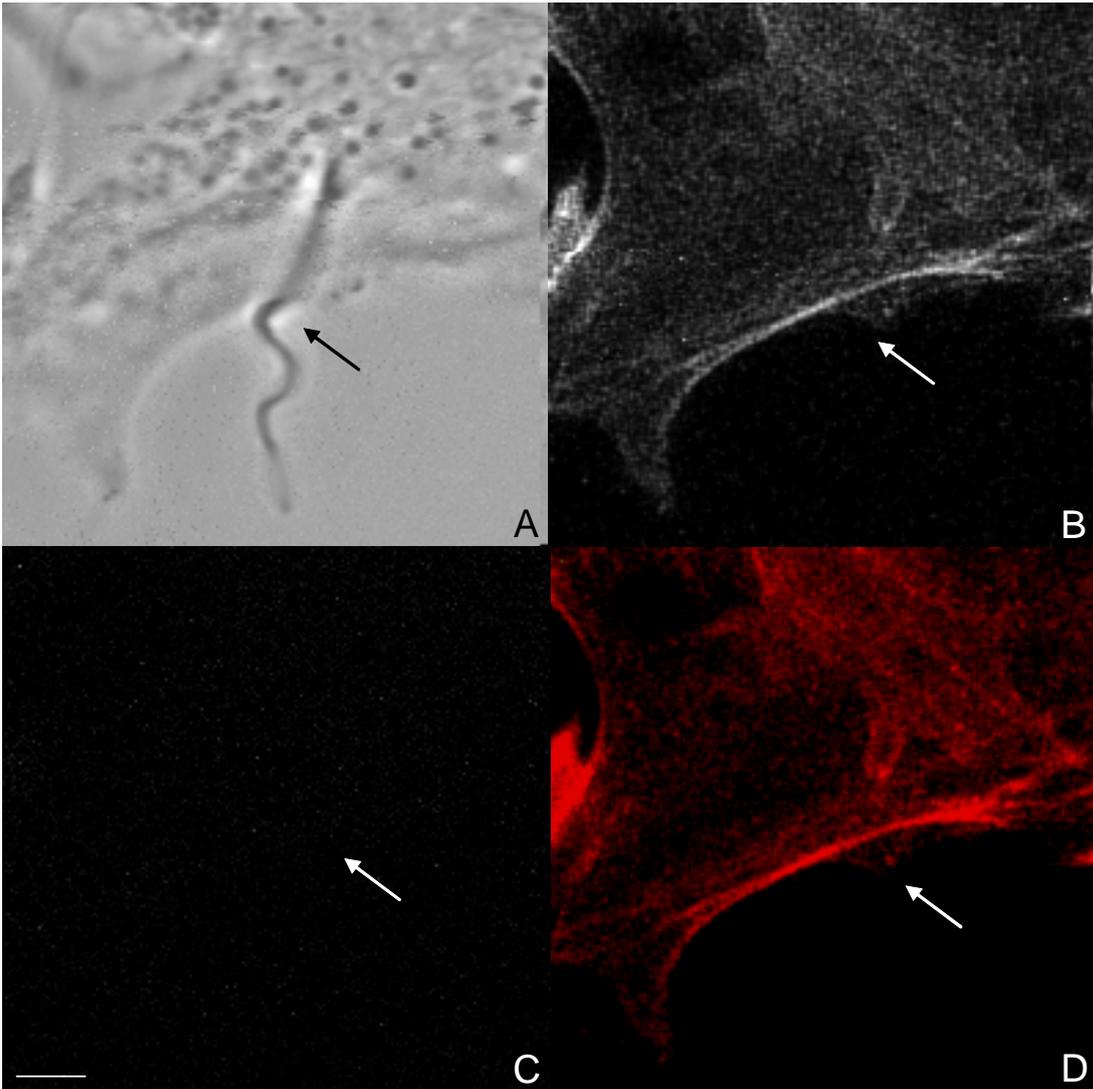


FIGURA 6: Microscopia confocal a laser de fibroblastos T-17 *-/-* colocados para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com faloidina – rodamina (1:40) por 30 minutos (B) e posteriormente incubadas com e anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio), seguido de anticorpo secundário ALEXA- 488 (1:400) (C). Nota-se a presença de uma forma tripomastigota já sendo internalizada (A-seta) e a ausência de concentração de F-actina ao redor do sítio de entrada (B). Como esse fenótipo não expressa paxilina, não há marcação (C) nem sobreposição de imagens (D). As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Tripomastigota (seta); Barra = 5µm.

Para confirmar se essa fosforilação em tirosina está relacionada a uma concentração de paxilina no sítio de entrada do parasita, decidimos incubar as células com anti-fosfotirosina seguido de anti-paxilina em todos os tipos celulares em questão. O que observamos no caso de células LLC-MK₂ infectadas (Figura 7) é um padrão diferente do que esperávamos. Quando observamos a marcação para anti-fosfotirosina (Figura 7C) notamos uma intensa marcação ao redor do vacúolo contendo o parasita recém internalizado (Figura 7C – cabeça de seta) enquanto a marcação apareceu mais discreta nos parasitas ainda aderidos ou em processo de internalização (Figura 7C – setas). No caso da marcação para paxilina (Figura 7B), esse padrão mais intenso de marcação se repetiu no caso do vacúolo contendo o parasita (Figura 7B-cabeça de seta), mas, no caso dos outros tripomastigotas, a marcação foi muito mais fraca que a marcação para anti-fosfotirosina (Figura 7C-setas). Quando sobrepostas (Figura 7D), notamos uma co-localização apenas na área que corresponde ao vacúolo contendo um parasita internalizado. Nos outros parasitas, foi possível identificar a marcação para anti-fosfotirosina (em vermelho) bem distinta da marcação para anti-paxilina (em verde).

Já em macrófagos (Figura 8) observamos a concentração de fosfotirosina no sítio de adesão do parasita (Figura 8C- cabeça de seta) assim como uma concentração de paxilina (Figura 8B- cabeça de seta). Tal padrão não foi observado no outro parasita indicado pela seta, sugerindo uma heterogeneidade nas vias de sinalização que culminam com a internalização do parasita. Para observar o comportamento da fosforilação em tirosina e da participação da paxilina em células que não expressam a paxilina, também incubamos os fibroblastos T-17 com anti-fosfotirosina e anti-paxilina. No fenótipo CPax (Figura 9), observamos um padrão similar ao visto em células LLC-MK₂ (Figura 7), aonde não houve uma intensa marcação para anti-

fosfotirosina (Figura 9C-seta) e nem para anti-paxilina (Figura 9B-seta) no sítio de adesão do parasita. Quando as imagens foram sobrepostas (Figura 9D), podemos distinguir as duas marcações, sem co-localização. Para o fenótipo T-17 *-/-*, deficiente em paxilina (Figura 10) não observamos uma concentração de fosfotirosina (Figura 10C) e nenhuma marcação para paxilina (Figura 10B), deixando apenas a marcação vermelha para fosfotirosina evidente quando as imagens foram sobrepostas (Figura 10D).

4.4. Detecção de paxilina por *Western Blotting*.

Avaliamos se a paxilina estava sendo traduzida e se o reconhecimento mostrado por imunofluorescência era específico para a paxilina e não para outros membros da família, como a Hic-5, todos os tipos celulares foram submetidos à análise por *Western Blotting*. Para isso, as células foram preparadas conforme descrito no item 3.8 dos Materiais & Métodos. Como observamos na revelação por ECL (Figura 11), notamos a presença de uma banda com cerca de 70KDa (cabeça de seta) nas linhas contendo o extrato de T-17 CPax (linha 2), LLC-MK₂ (linha 3) e macrófagos (linha 4), confirmando que o fenótipo *-/-* não expressou paxilina mesmo após a diferenciação para fibroblasto T-17 (linha 1). Existe a presença de outra banda mais abaixo, com cerca de 50 KDa que também foi reconhecida pelo anticorpo anti-paxilina e, provavelmente, corresponde ao produto de *splicing* da paxilina, dando origem à Hic-5. Nesse caso, mesmo o fenótipo *-/-* pode expressar a Hic-5, uma vez que a deleção foi somente no gene para paxilina.

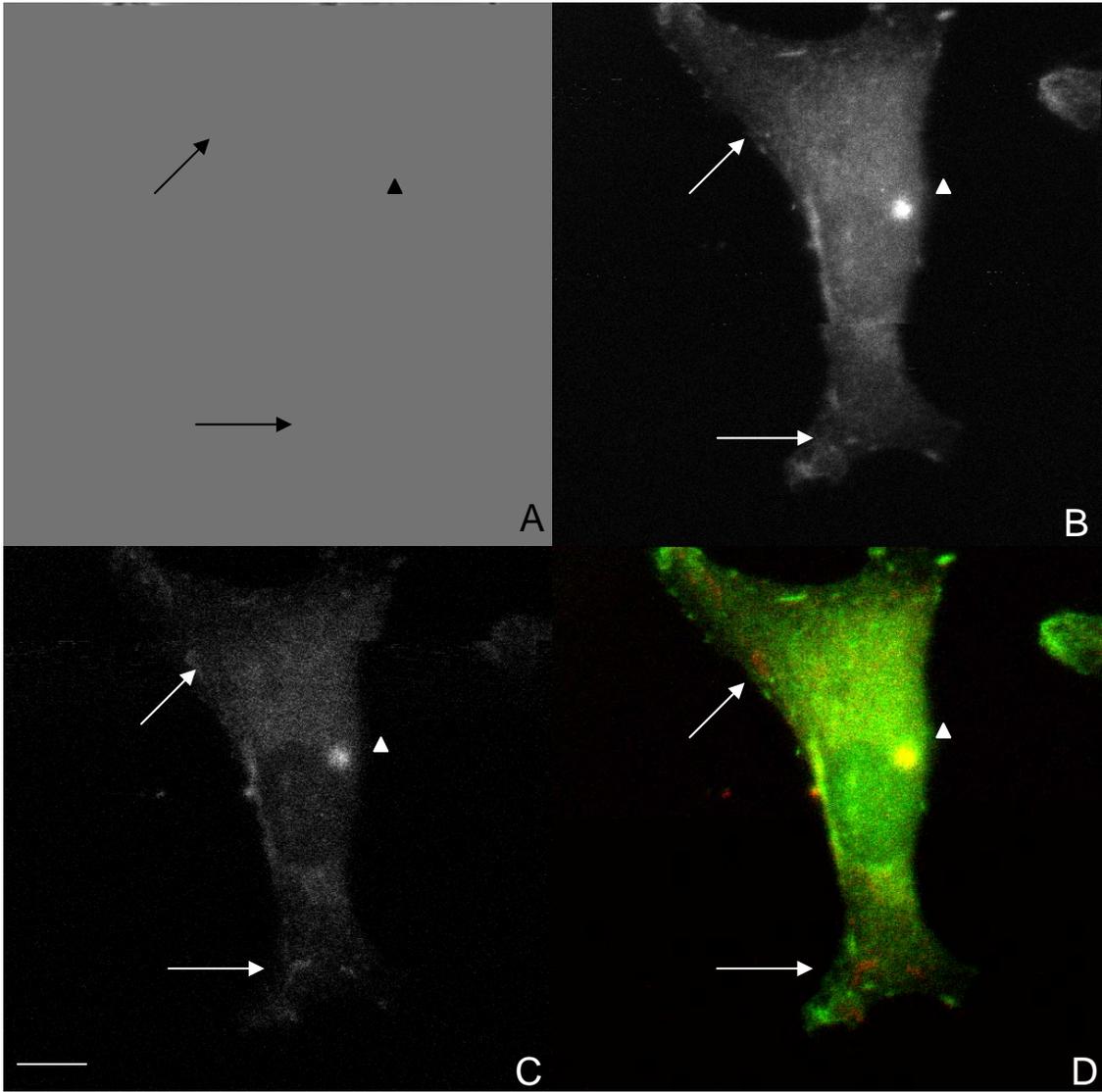


FIGURA 7: Microscopia confocal a laser de células LLC-MK₂ colocadas para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio) (B) e anti-fosfotirosina (1:250) por uma hora (C), seguidos de anticorpo secundário ALEXA- 546 (1:100 para revelar a marcação com anti-fosfotirosina) e ALEXA-488 (1:400 para revelar a marcação do anti-paxilina). Note a concentração de paxilina (B) e fosfotirosina (C) e ao redor do vacúolo (cabeça de seta), enquanto outras formas tripomastigotas mostram somente a marcação para fosfotirosina (seta). As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Tripomastigota aderido (seta), tripomastigota dentro do vacúolo (cabeça de seta). Barra = 10µm.

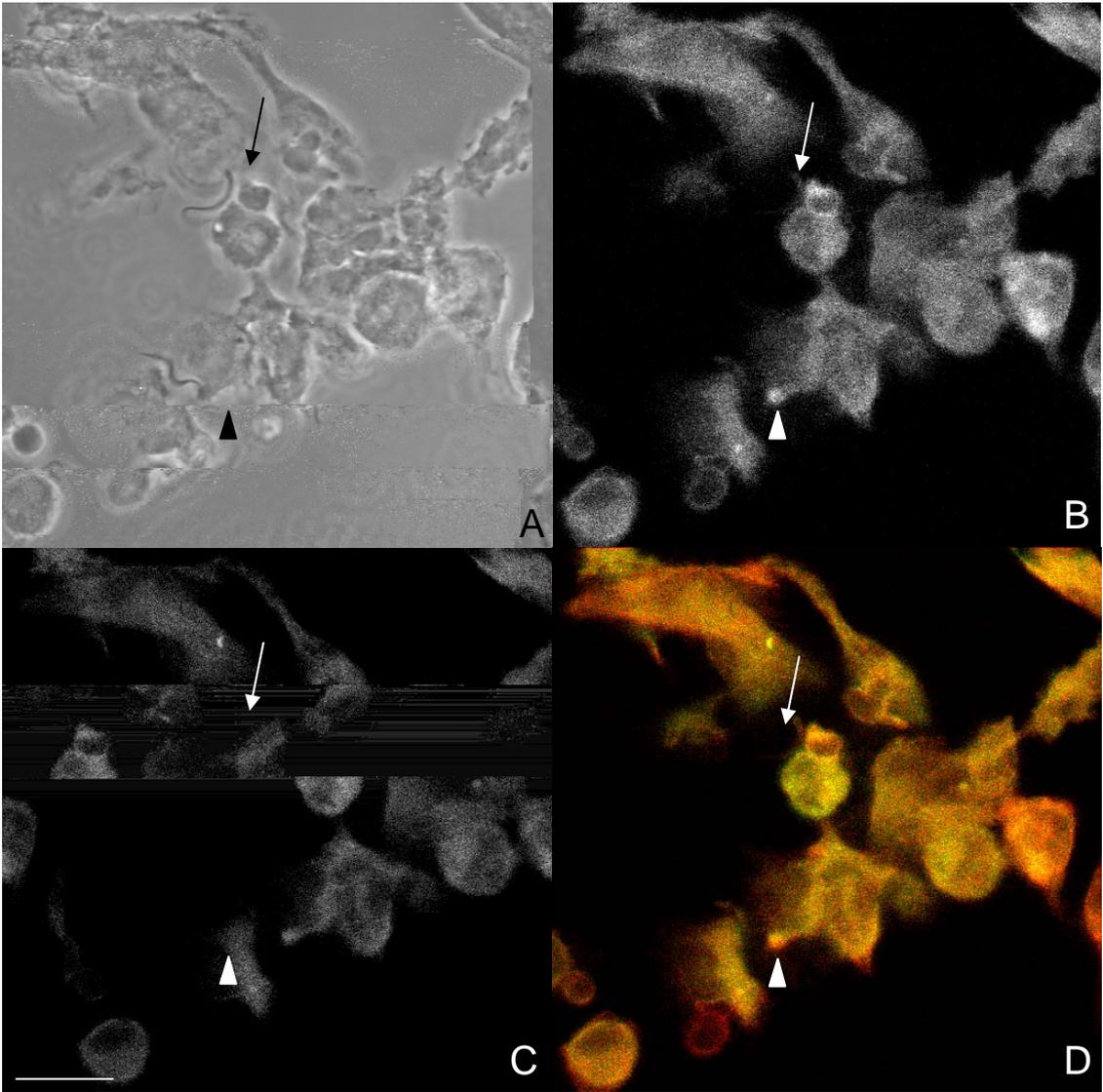


FIGURA 8: Microscopia confocal a laser de macrófagos colocados para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio) (B) e anti-fosfotirosina (1:250) por uma hora (C), seguidos de anticorpo secundário ALEXA- 546 (1:100 para revelar a marcação com anti-fosfotirosina) e ALEXA-488 (1:400 para revelar a marcação do anti-paxilina). Note a concentração de paxilina (B) e fosfotirosina (C) no parasita que parece estar em processo de internalização (cabeça de seta). Nesse caso observamos uma co-localização de paxilina e fosfotirosina (D). As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Tripomastigota (seta), tripomastigota aderido (cabeça de seta). Barra = 10 μ m.

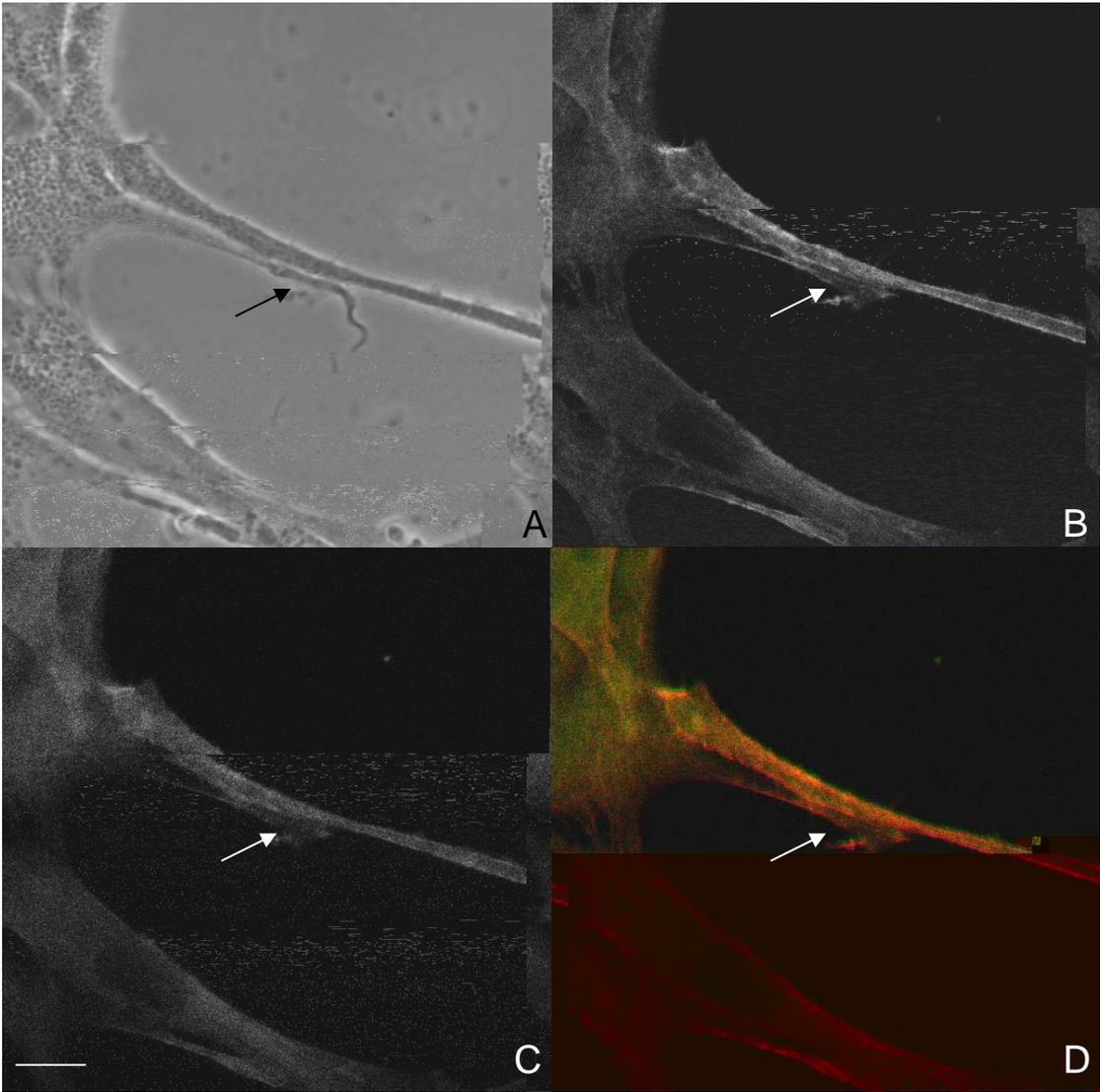


FIGURA 9: Microscopia confocal a laser de fibroblastos T-17 CPax colocados para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio) (B) e anti-fosfotirosina (1:250) por uma hora (C), seguidos de anticorpo secundário ALEXA- 546 (1:100 para revelar a marcação com anti-fosfotirosina) e ALEXA-488 (1:400 para revelar a marcação do anti-paxilina). Observamos a presença de uma forma tripomastigota em processo de internalização (A –seta), sem uma concentração de paxilina (B) e fosfotirosina (C) ao redor do sítio de entrada do parasita.As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Tripomastigota (seta). Barra = 5µm.

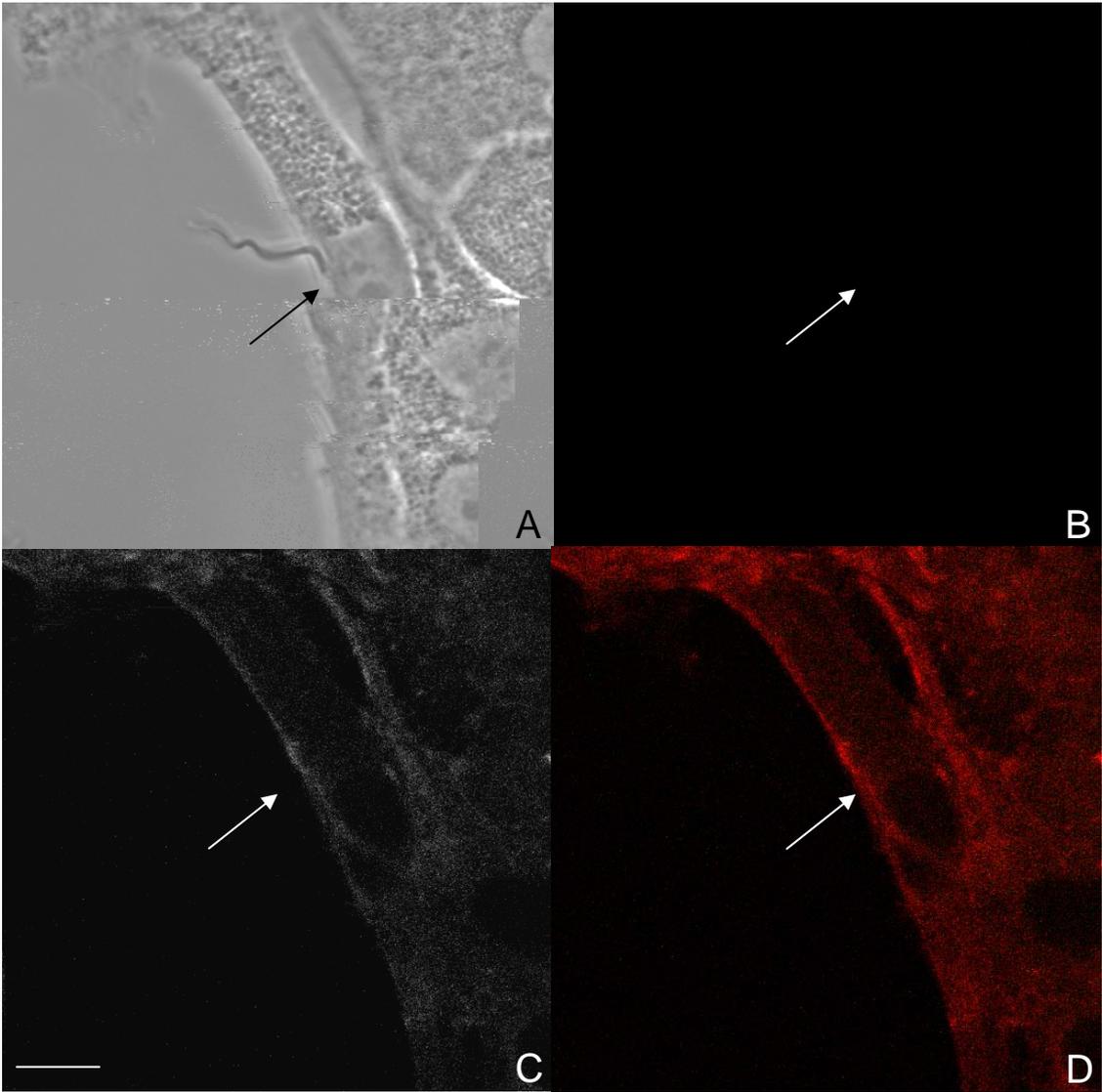


FIGURA 10: Microscopia confocal a laser de fibroblastos T-17 -/- colocados para interagir por uma hora com formas tripomastigotas de *T.cruzi*. As células foram plaqueadas, infectadas, fixadas, permeabilizadas e incubadas com anti-paxilina (1:100 em tampão de bloqueio) (B) e anti-fosfotirosina (1:250) por uma hora (C), seguidos de anticorpo secundário ALEXA- 546 (1:100 para revelar a marcação com anti-fosfotirosina) e ALEXA-488 (1:400 para revelar a marcação do anti-paxilina). Observe a presença de uma forma tripomastigota (A - seta) invadindo a célula, mas parece existir uma concentração de fosfotirosina (B) mesmo diante da ausência de paxilina (C).As imagens foram obtidas em contraste de fase (A) e sobrepostas para revelar a co-localização das duas marcações (D). Tripomastigota (seta). Barra = 5µm.

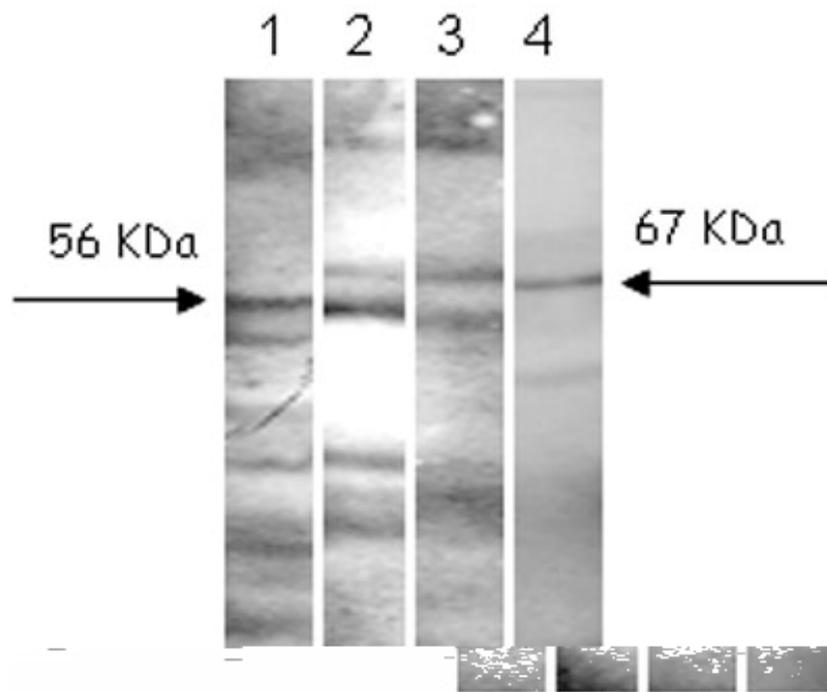


FIGURA 11: Western blotting mostrando a presença de paxilina em macrófagos, LLC-MK₂ e fibroblastos T-17. O extrato protéico de cada tipo celular foi aplicado em um SDS-PAGE 7,5% , eletrotransferido para uma membrana de nitrocelulose, incubado com anti-paxilina (1:100) e revelado com auxílio do kit ECL. Linha 1: T-17 -/-; Linha 2: T-17 CPax; Linha 3: LLC-MK₂ e Linha 4: macrófago. Banda de 67KDa correspondente a paxilina; banda de 56 KDa correspondente a Hic-5.

4.5. Efeito do tratamento com metil β -ciclodextrina nos índices de adesão e internalização de epimastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi*.

Para avaliar a participação de componentes lipídicos da membrana plasmática das células hospedeiras no processo de adesão, internalização e sobrevivência do *Trypanosoma cruzi*, testamos o efeito da metil β -ciclodextrina

sobre células hospedeiras. Primeiramente testamos a capacidade de epimastigotas aderirem e serem internalizados por macrófagos tratados e não tratados com metil β -ciclodextrina (Figura 12 A). Para isso, macrófagos foram incubados com 5, 10 e 20 mM de metil β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C, lavados para remover a droga e colocados em contato com epimastigotas de *T.cruzi* por mais 30 minutos. Após essa interação as células foram processadas para microscopia óptica de campo claro, possibilitando a determinação dos índices de adesão e internalização. Como resultado do efeito da droga, observamos um aumento nos índices de adesão (cerca de 80%) e internalização (cerca de 63%) na concentração de 5 mM, mostrando que a droga estaria facilitando a adesão e a posterior internalização de epimastigotas por macrófagos. Conforme a concentração aumenta, os índices começaram a cair. Já com 10 mM observamos uma redução dos índices quando comparados a concentração de 5 mM, mas ainda foi maior que os índices do controle. Na concentração de 20 mM os índices voltaram a cair, chegando próximo ao calculado para o controle. O índice de internalização chegou a valores próximos do controle (6,7 comparado a 7,1 do controle), entretanto o índice de adesão mostrou uma redução drástica quando comparado ao controle (1,22 comparado a 5,1 do controle). Quando macrófagos pré-tratados foram colocados em contato com tripomastigotas, esse perfil muda (Figura 12 B). Nesse caso todas as concentrações testadas mostraram uma redução no índice de internalização quando comparadas ao controle, entretanto, o índice de adesão aumentou a partir da concentração de 10 mM, chegando a ser o maior índice de adesão entre todos os pontos, incluindo o controle. Na concentração de 20 mM o índice continua maior que o controle, mas não superou o valor do índice em 10 mM.

Para determinar o efeito da metil β -ciclodextrina em células não-fagocíticas profissionais, usamos as células LLC-MK₂ para calcular os índices de

adesão e internalização após o tratamento com 5, 10 e 20 mM da droga (Figura 13). No caso da interação com epimastigotas (Figura 13 A), o tratamento pareceu não afetar os índices de adesão, mantendo-os similares ao controle. Já o índice de internalização se mostrou bem reduzido no controle, uma vez que essa linhagem não foi considerada um fagócito profissional e a forma epimastigota não tem a capacidade de invadir ativamente, mas sofre uma pequena elevação quando tratada com 5 mM da droga. Nas demais concentrações não houve sequer como calcular o índice. Quando a forma tripomastigota foi colocada nas células pré-tratadas, esse perfil mudou completamente (Figura 13 B). No controle observamos uma quase equivalência dos valores de adesão e internalização, mostrando que cada parasita aderido acaba sendo internalizado, o que torna essa linhagem muito suscetível à entrada ativa do parasita. Quando as células foram tratadas com 5 mM da droga, os índices caíram quase pela metade, mostrando que a ação da metil β -ciclodextrina estava afetando tanto a adesão e, conseqüentemente, a internalização. Já nas concentrações mais altas observamos uma inversão no perfil de adesão e internalização, com altas taxas de adesão que não refletem um aumento na internalização. Mesmo mostrando um aumento discreto no índice de internalização nas concentrações de 10 e 20 mM, ainda não atingiu valores próximos ao controle.

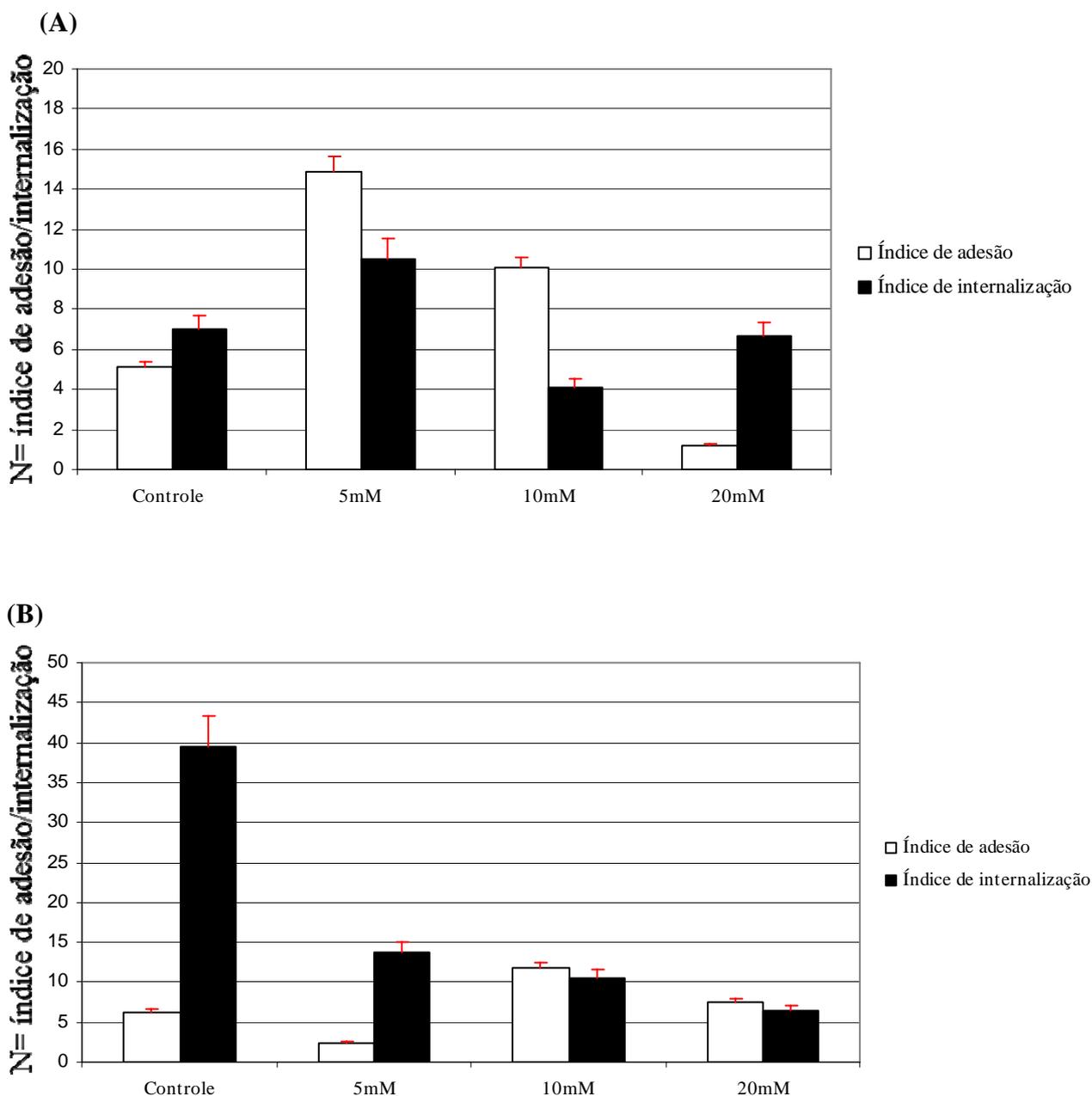


FIGURA 12: Histograma mostrando os índices de adesão (barras claras) e internalização (barras escuras) de epimastigotas (A) e tripomastigotas (B) após o tratamento de macrófagos com a metil β -ciclodextrina (5, 10 e 20 mM) durante 30 minutos a 37°C antes das interações. Os índices foram calculados a partir da média de 3 experimentos e estatisticamente tratados pelo teste T de Student (com intervalo de confiança de $p \leq 0,05$)(barra vermelha).

Índice de adesão = (número de células com parasitas aderidos x 100/número de células totais) x (número de parasitas aderidos/ número de células com parasitas

Índice de internalização = (número de células com parasitas internalizados x 100/número de células totais) x (número de parasitas internalizados/ número de células com parasitas internalizados).

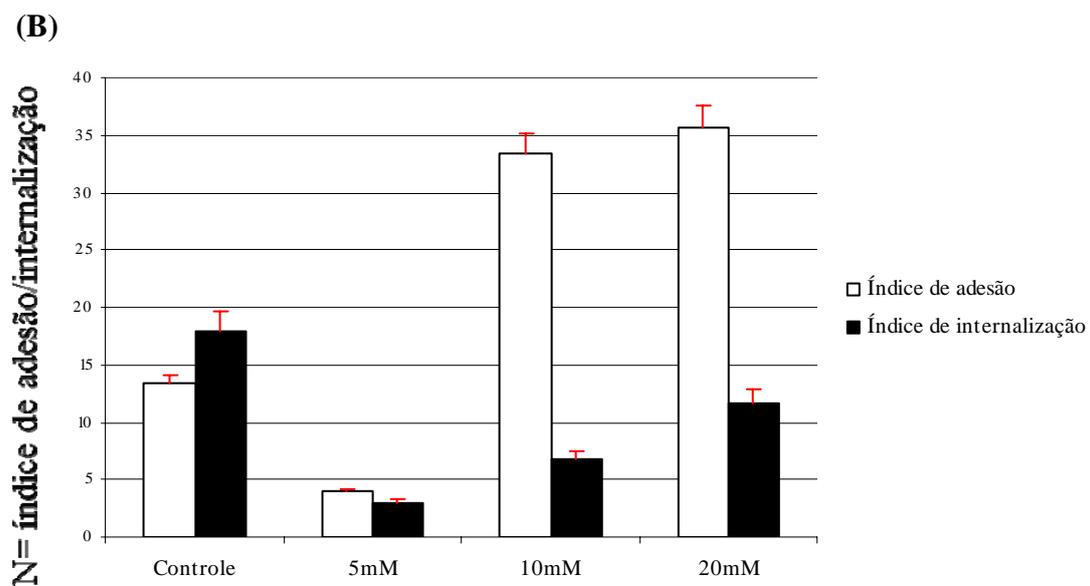
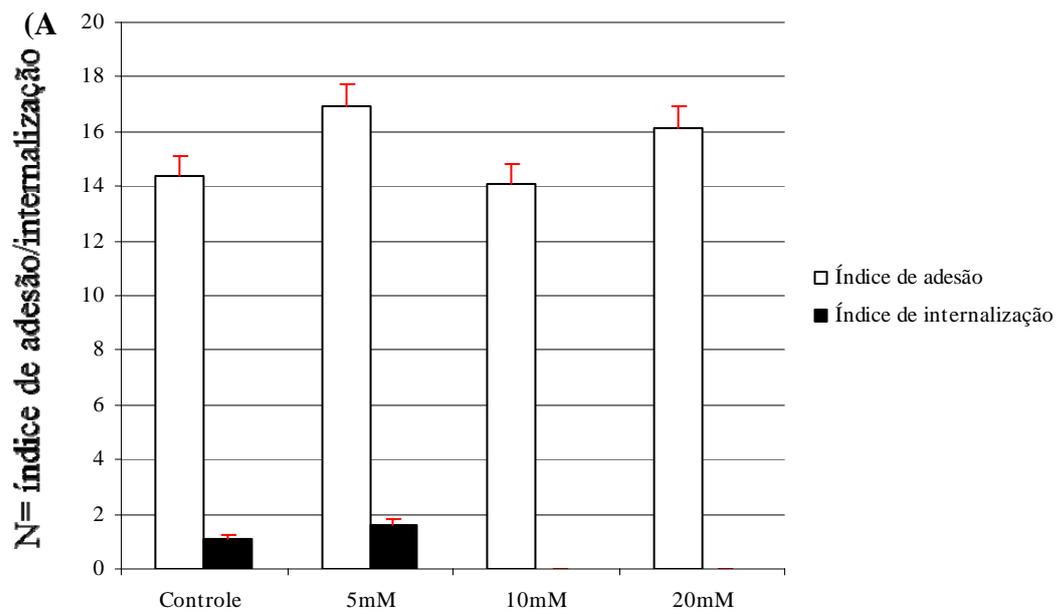


FIGURA 13: Histograma mostrando os índices de adesão (barras claras) e internalização (barras escuras) de epimastigotas (A) e tripomastigotas (B) após o tratamento de LLC-MK₂ com a metil β -ciclodextrina (5, 10 e 20 mM) durante 30 minutos a 37°C antes das interações. Os índices foram calculados a partir da média de 3

experimentos e estatisticamente tratados pelo teste T de Student (com intervalo de confiança de $p \leq 0,05$)(barra vermelha).

Índice de adesão = (número de células com parasitas aderidos x 100/número de células totais) x (número de parasitas aderidos/ número de células com parasitas

Índice de internalização = (número de células com parasitas internalizados x 100/número de células totais) x (número de parasitas internalizados/ número de células com parasitas internalizados).

4.6. Determinação do índice de sobrevivência do *T.cruzi* em células pré-tratadas com metil β -ciclodextrina.

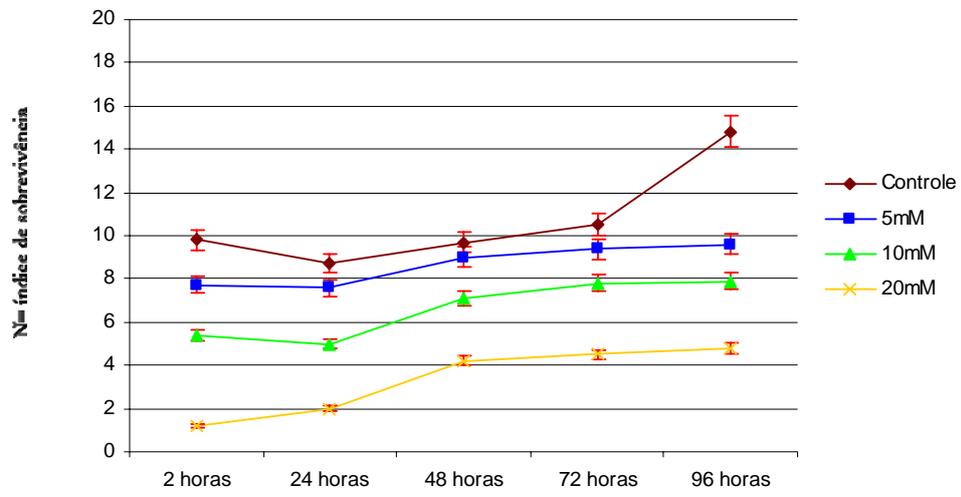
Com as alterações encontradas nos índices de adesão e internalização após o tratamento com metil β -ciclodextrina, decidimos investigar a capacidade do parasita sobreviver em células depletadas de colesterol. Para isso, macrófagos e células LLC-MK₂ foram pré-tratadas com 5, 10 e 20 mM de metil β -ciclodextrina antes da infecção com tripomastigotas. Como controle, após o tratamento com a droga, o colesterol foi repostado nas células através da incubação durante uma hora com 20% de soro fetal bovino para só então entrarem em contato com os parasitas. Na interação de tripomastigotas com macrófagos pré-tratados (Figura 14 A), observamos uma redução dose dependente no número de parasitas intracelulares quando comparados ao controle, chegando a níveis muito baixos com 20mM. Isso mostrou que a depleção de colesterol afetou não só os índices de adesão e internalização como também reduziu a capacidade do parasita proliferar no interior dessas células. Já com a reposição de parte do colesterol removido através da incubação com soro fetal bovino, o índice de sobrevivência mostrou-se menos alterado, com exceção da concentração de 20 mM (Figura 14 B), do que os

resultados das células tratadas (Figura 14 A). As concentrações de 5 e 10 mM mostraram uma pequena redução quando comparado ao controle, ou seja, em baixas concentrações de metil β -ciclodextrina a célula não perdeu a capacidade de recuperar o colesterol depletado pela ação da droga, mesmo que de uma fonte exógena como o soro fetal bovino.

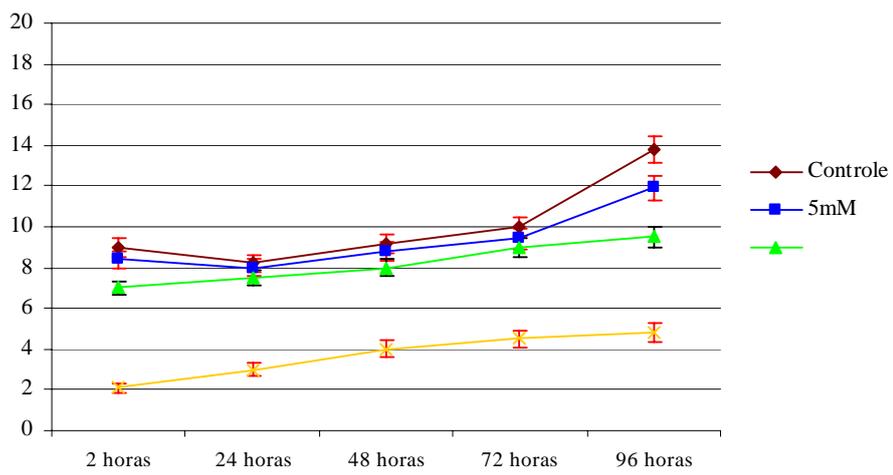
Quando a célula em questão não é considerada um fagócito profissional, o perfil foi um pouco diferente do observado em macrófagos. Nas células LLC-MK₂ pré-tratadas e infectadas com tripomastigotas de *T.cruzi* (Figura 15A), observamos uma semelhança com o padrão de sobrevivência do controle da figura 14 A, entretanto existe uma inversão nas concentrações de 5, 10 e 20 mM. Nesse caso, a maior concentração (20 mM) mostrou um maior número de parasitas internalizados após duas horas de infecção, mas obteve o menor número com 96 horas enquanto que a concentração de 5 mM mostrou o inverso, com um baixo número de parasitas após duas horas e uma sobrevivência melhor do que a concentração de 20 mM, após 96 horas.

Com a reposição de colesterol (Figura 15 B), o controle permaneceu muito similar aos controles anteriores, entretanto também houve uma inversão entre os valores das concentrações de 5 mM. Nesse caso, a concentração de 10 mM mostrou mais parasitas no início e maior sobrevivência do que a concentração de 5 mM, sugerindo que quanto mais intensa a remoção de colesterol, maior a capacidade de recuperação das células. Mais uma vez a sobrevivência no interior de células tratadas com 20 mM parece ser muito prejudicada, indicando que mesmo repondo o colesterol existe algum mecanismo que compromete muito a estabilidade da célula e o sucesso da infecção.

(A)



(B)



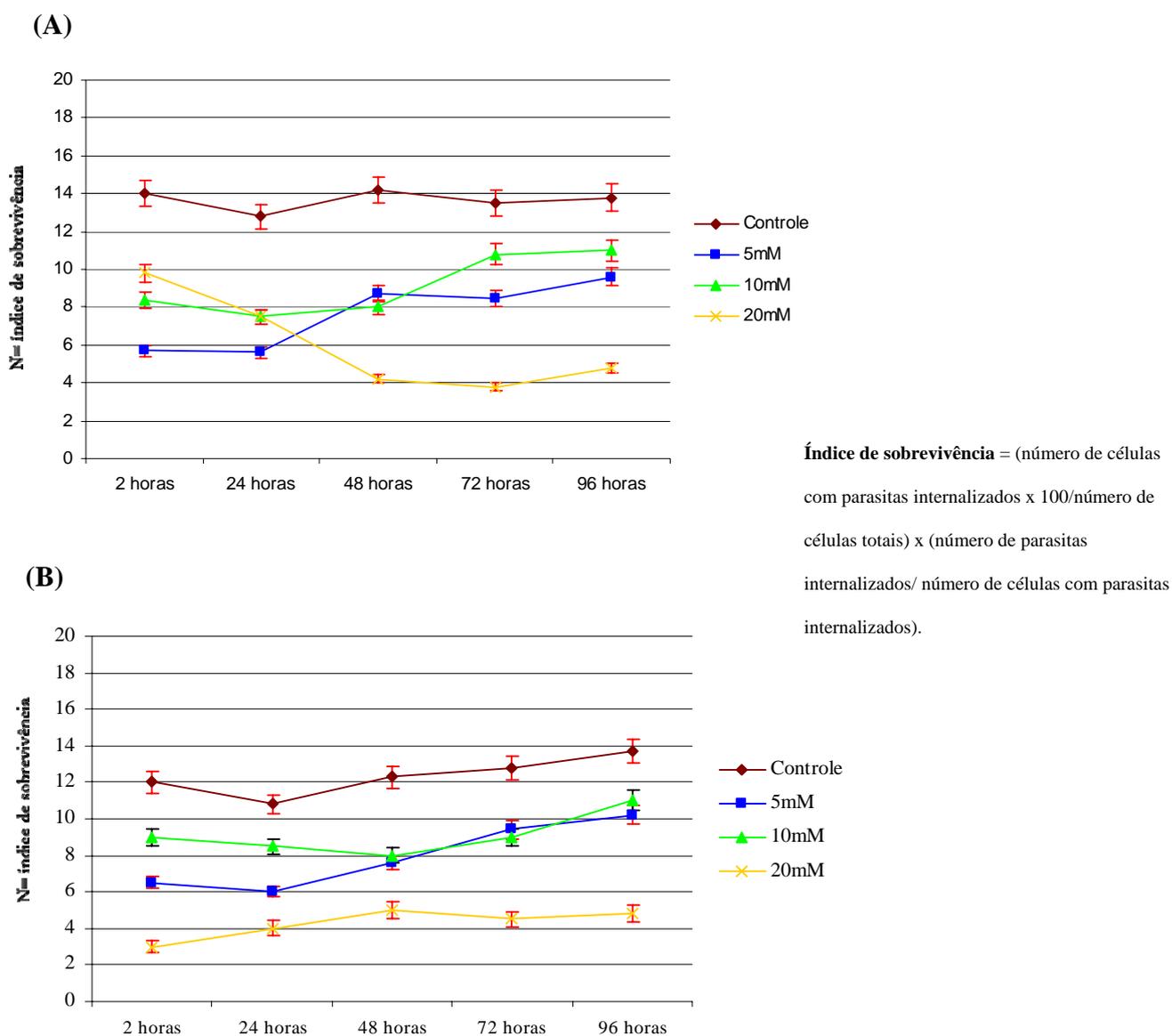


FIGURA 15: Gráficos mostrando o índice de infecção após 1, 24, 48, 72 e 96 horas de LLC-MK₂ pré-tratadas com 5, 10 e 20 mM de a metil β-ciclodextrina e infectados por uma hora com tripomastigotas de *T. cruzi* (A). Para reverter a depleção de colesterol, as células foram incubadas em 20% de soro fetal bovino por duas após a remoção da droga e antes da interação (B). Os índices foram calculados a partir da média de 2 experimentos e estatisticamente tratados pelo teste *T* de Student (com intervalo de confiança de $p \leq 0,05$)(barra vermelha).

4.7. O efeito do tratamento com filipina sobre os índices de adesão e internalização de células infectadas com tripomastigotas de *T.cruzi*.

Para avaliar o papel da filipina, um antibiótico poliênico que penetra nas células e se liga ao colesterol, formando complexos de 20-30nm que alteram a estrutura da membrana, deixando uma aparência “enrugada”, dependendo do tipo celular em questão, incubamos macrófagos (Figura 16A) e células LLC-MK₂ (Figura 16B) com concentrações crescentes de 1, 3 e 6 mM de filipina previamente à interação com tripomastigotas de *T.cruzi*.

No caso de macrófagos (Figura 16A) podemos observar, com exceção da concentração de 3mM, que existiu uma redução dose-dependente nos dois índices analisados, mostrando que o efeito da filipina afetou a capacidade de adesão e , conseqüentemente , internalização de macrófagos tratados.

Para células da linhagem LLC-MK₂ (Figura 16B), a adesão diminuiu drasticamente enquanto que a internalização subiu conforme aumentou a concentração de filipina, mais uma vez com exceção da concentração de 3 mM, que não acompanhou o aumento de internalização.

4.8. Localização de plataformas de membrana, através da microscopia de fluorescência, com auxílio da toxina do cólera em macrófagos infectados com *T.cruzi*.

Uma vez que os resultados com metil β -ciclodextrina e filipina alteraram significativamente a interação célula hospedeira x tripomastigotas de *T.cruzi*, decidimos observar se ocorria a entrada preferencial de parasitas em regiões ricas no gangliosídeo GM1, marcador de plataformas de membrana. Para isso, utilizamos a subunidade B da toxina do cólera conjugada a fluoresceína. As células foram plaquedadas, incubadas com a toxina a 4°C para evitar a endocitose da molécula, colocadas em contato com

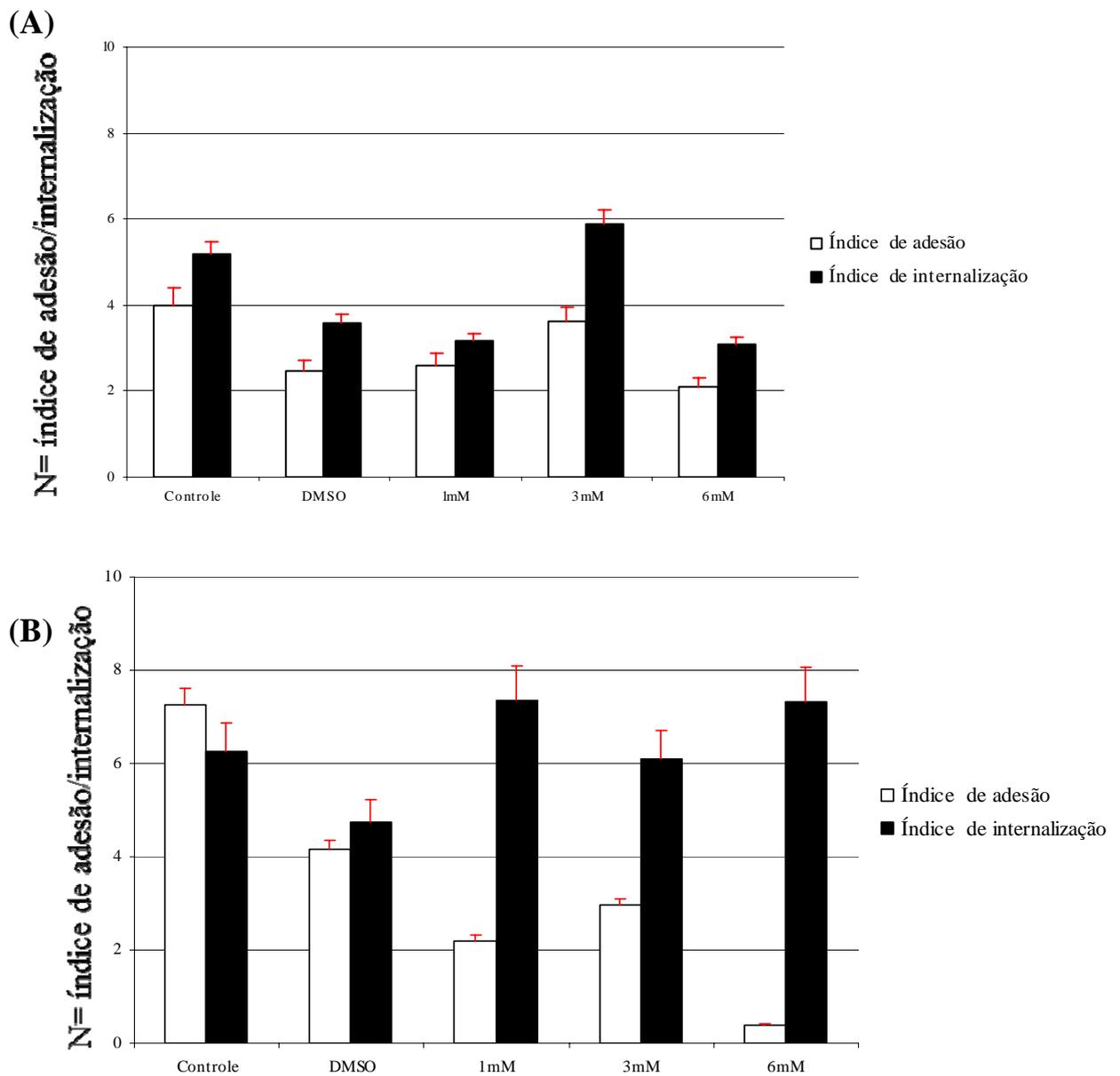


FIGURA 16: Determinação dos índices de adesão (barras claras) e internalização (barras escuras) de tripomastigotas em macrófagos (A) e LLC-MK2 (B) após o tratamento com filipina (1, 3 e 6mM) durante 30 minutos antes das interações. Os índices foram calculados a partir da média de 3 experimentos e estatisticamente tratados pelo teste *T* (com intervalo de confiança de $p \leq 0,05$)(barra vermelha).

Índice de adesão = (número de células com parasitas aderidos x 100/número de células totais) x (número de parasitas aderidos/ número de células com parasitas

Índice de internalização = (número de células com parasitas internalizados x 100/número de células totais) x (número de parasitas internalizados/ número de células com parasitas internalizados).

tripomastigotas por 30 minutos ainda a 4°C e elevadas para 37°C após esse tempo. Como podemos ver na Figura 17, a toxina se distribuiu por toda membrana do macrófago não infectado com áreas mais concentradas (setas), identificando possíveis plataformas de membrana. Quando os macrófagos foram colocados para interagir com formas tripomastigotas (Figura 18 – cabeça de seta), continuamos observando o mesmo padrão de distribuição pela membrana, inclusive quando a interação foi feita a 4°C (Figuras 18 A, B, C e D). Mesmo após elevar a temperatura para 37°C e facilitar a fagocitose para os macrófagos, não observamos nenhuma concentração preferencial no sítio de entrada do parasita (Figuras 18 E e F).

4.9. Alterações na morfologia de células tratadas com metil β -ciclodextrina e infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* – microscopia eletrônica de varredura.

Diante dos resultados observados após o tratamento das células hospedeiras com metil β -ciclodextrina, decidimos investigar o papel da droga sobre a morfologia de um tipo celular, no caso macrófagos. Para isso, macrófagos foram incubados com 20 mM de metil β -ciclodextrina, lavados para remover a droga e colocados para interagir durante 30 minutos com tripomastigotas de *T. cruzi*. As amostras foram observadas por microscopia eletrônica de varredura. Como podemos observar na Figura 19, os macrófagos pré-tratados e não infectados apresentaram alterações na membrana plasmática, como o aparecimento de grandes depressões na membrana (Figura 19E – seta) que não apresentam rompimento em nenhum ponto e um menor número de filopódios, sugerindo que o tratamento tenha alterado a capacidade da membrana de se manter estendida pela superfície onde a célula mantém pontos de adesão com o substrato.

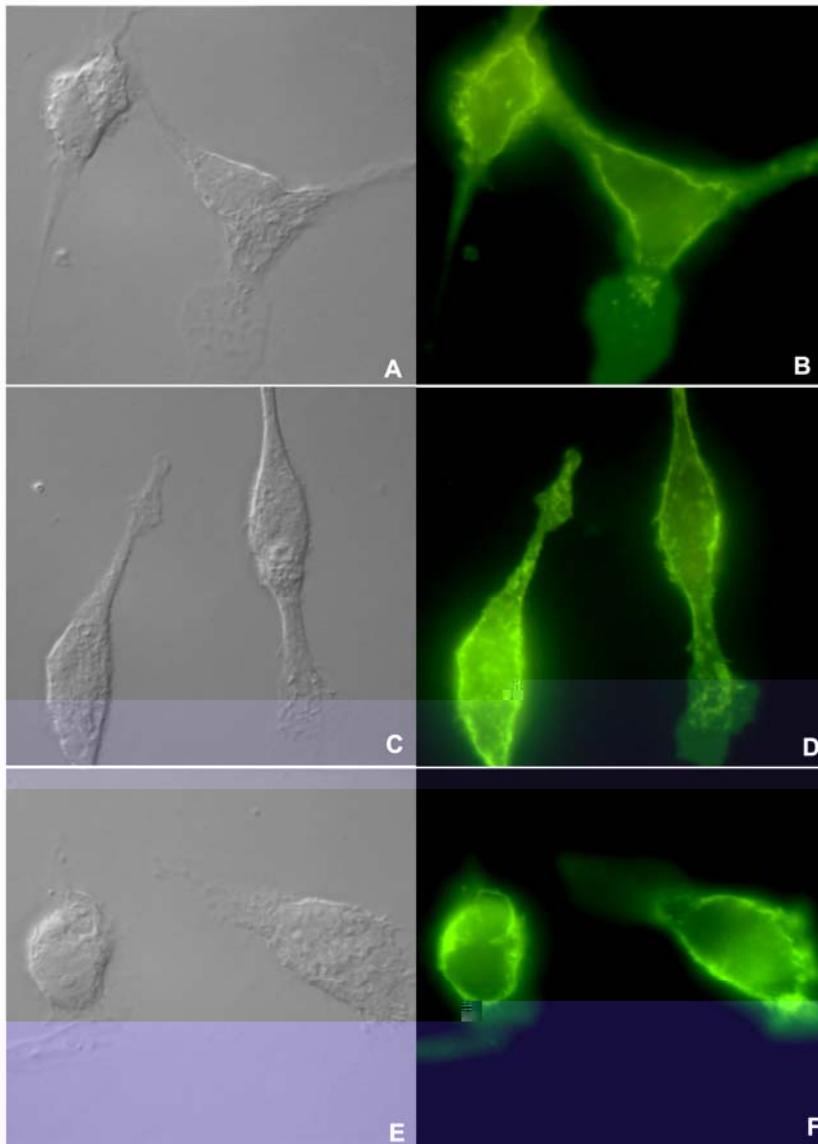


FIGURA 17: Macrófagos incubados com 100 µg/mL da subunidade B da toxina do cólera ligada a fluoresceína (CTB-FITC) durante 30 minutos a 4°C, lavados e fixados com 2% de paraformaldeído. A toxina se distribui pela membrana do macrófago, mais concentrada em alguns pontos (setas), sugerindo a presença de plataformas de membrana nesses locais. As imagens foram obtidas em contraste interferencial no microscópio de fluorescência Axioplan (Zeiss). Concentração de CTB-FITC (seta). Barra=5 µm.

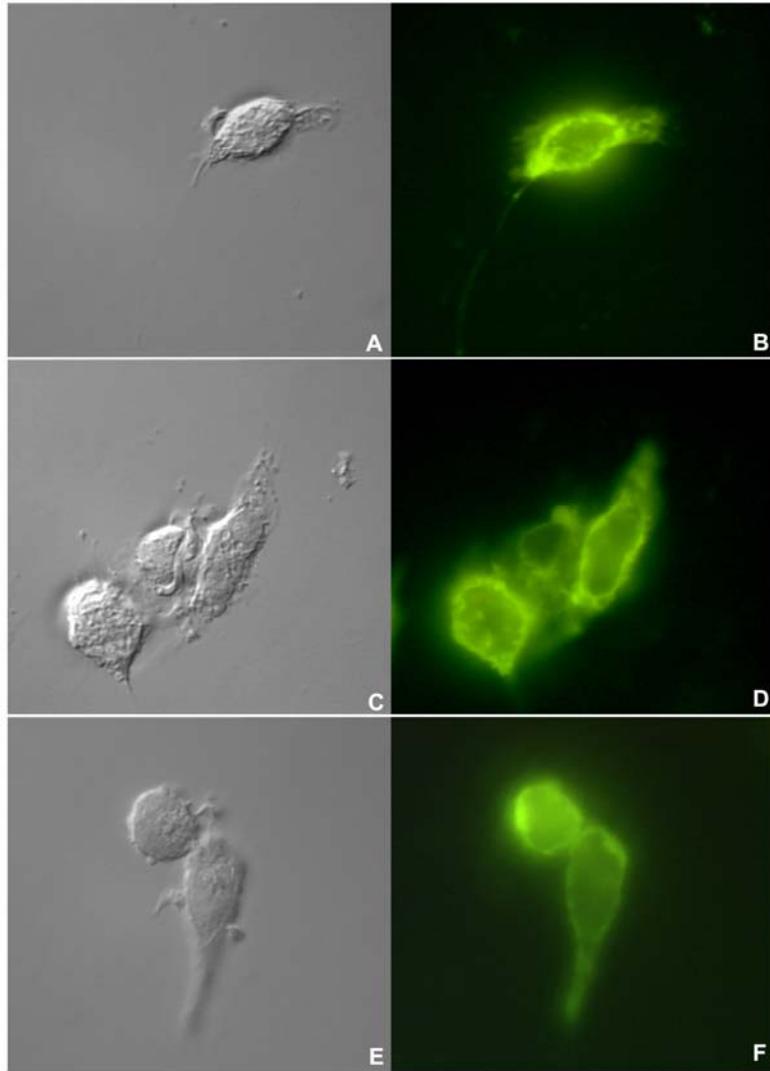


FIGURA 18: Macrófagos incubados com 100 µg/mL da subunidade B da toxina do cólera ligada a fluoresceína (CTB-FITC) durante 30 minutos a 4°C, lavados, colocados em contato por mais 30 minutos a 4°C com tripomastigotas de *T.cruzi* (A – D) e fixados com 2% de paraformaldeído. Outra lamínula foi colocada a 37°C para facilitar a fagocitose dos macrófagos (E – F). Quando os macrófagos são colocados para interagir com tripomastigotas (cabeça de seta), observa-se o mesmo padrão de distribuição pela membrana, inclusive quando a interação é feita a 4°C (A, B, C e D). Mesmo após elevar a temperatura para 37°C, não observamos nenhuma concentração preferencial no sítio de entrada do parasita (E e F). As imagens foram obtidas em contraste interferencial no microscópio de fluorescência Axioplan (Zeiss). Tripomastigotas (cabeça de seta). Barra=5 µm.

Além das depressões que surgiram na membrana, também pudemos notar o acúmulo de estruturas amorfas, com aspecto de “restos” de membrana depositados em quase toda a extensão da membrana (Figuras 19C, D e E - seta larga). Outro aspecto muito comum entre as células observadas foi o padrão de invasão do parasita (Figuras 20 B e D). No caso de células tratadas, não observamos nenhuma alteração na morfologia do parasita, entretanto alguns tripomastigotas apresentaram “grumos” amorfos aderidos na sua superfície (Figura 20B), semelhantes aos vistos distribuídos na superfície dos macrófagos (Figuras 19C, D e E - seta larga). Mesmo com a presença desses grumos, os parasitas foram capazes de aderir e iniciar o processo de invasão (Figura 19D), confirmando os resultados anteriores onde o tratamento com metil β -ciclodextrina reduziu, mas não impediu completamente, a invasão do *T.cruzi*.

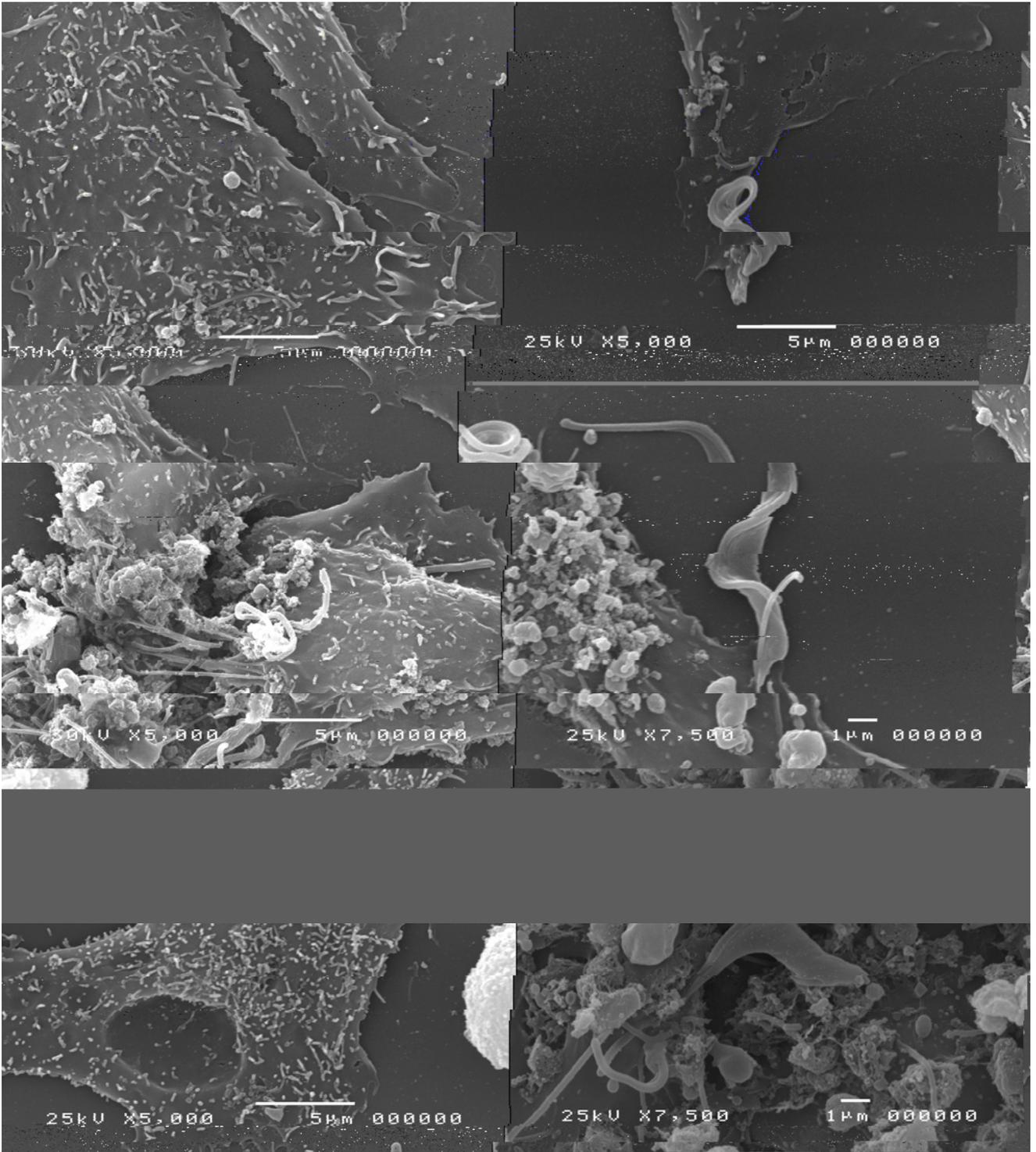


FIGURA 19: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando macrófagos tratados com 20 mM de a metil β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C e posteriormente infectados com tripomastigotas de *T.cruzi* por mais 30 minutos a 37°C. Macrófagos normais (A) macrófagos normais e infectados (B); macrófagos tratados com 20 mM de a metil β -ciclodextrina (C e E); e infectados com tripomastigotas de *T.cruzi* (D e F). Tripomastigotas (cabeça de seta); depressões na membrana (seta); grumos amorfos (seta larga).

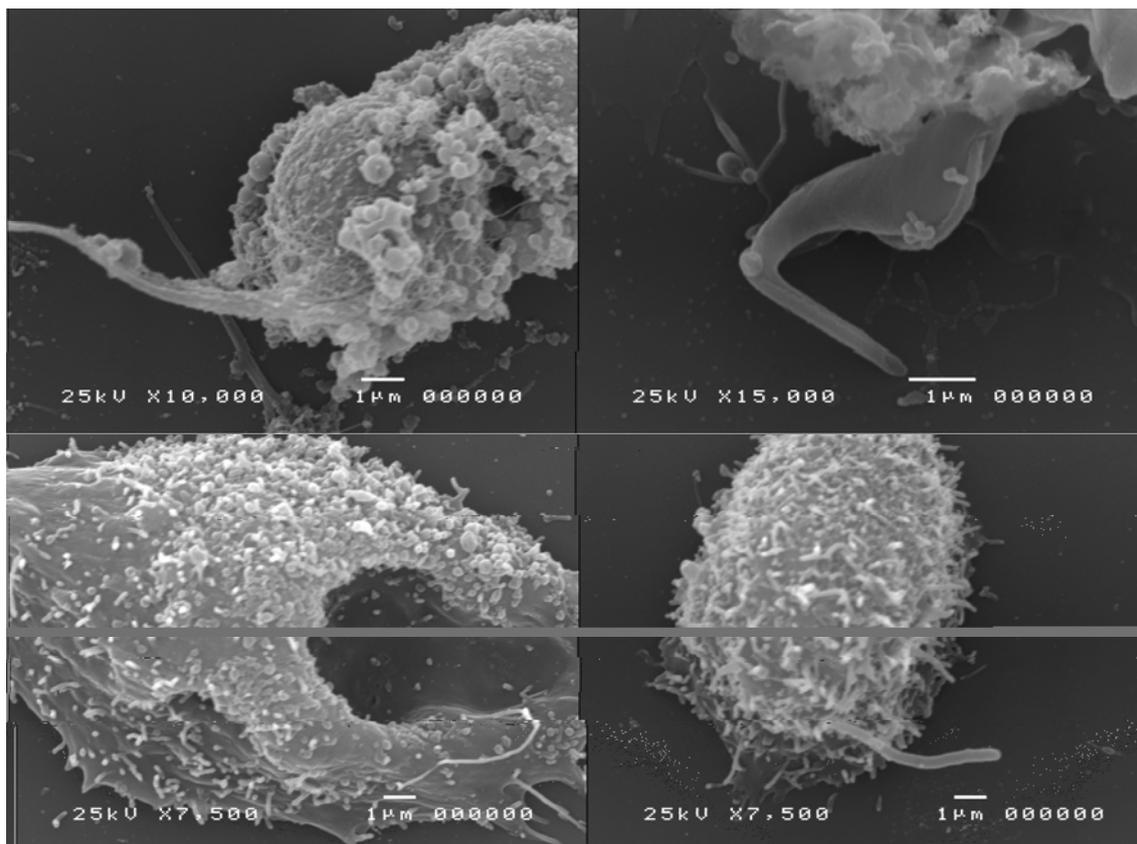


FIGURA 20: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostrando macrófagos tratados com 20 mM de a metil β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C e posteriormente colocados para interagir com tripomastigotas de *T.cruzi* por mais 30 minutos a 37°C. Macrófagos tratados com 20 mM de a metil β -ciclodextrina (A e C); e infectados com tripomastigotas de *T.cruzi* (B e D). Tripomastigotas (cabeça de seta); depressões na membrana (seta); grumos amorfos (seta larga).

4.10. Detecção de células em apoptose após o tratamento com metil β -ciclodextrina e o processo de interação com *T.cruzi*.

Durante os experimentos para determinar os índices de adesão, internalização e sobrevivência, notamos que as células tratadas com 20 mM de metil β -ciclodextrina apresentavam morte precoce, muitas vezes não atingindo 72 horas de sobrevivência, após a infecção com tripomastigotas de *T.cruzi*, além disso observações feitas após as marcações com DAPI mostraram que o núcleo dos macrófagos estava com aspecto fragmentado. Para caracterizar melhor o processo que estava levando as células à morte, decidimos analisar o comportamento do núcleo através da técnica de TUNEL. Por essa técnica podemos definir quais as células de uma cultura estão em processo de apoptose, ou seja, morte celular programada, após a indução por agentes apoptóticos como peróxido de hidrogênio. Após o tratamento com 20 mM de metil β -ciclodextrina por 30 minutos a 37°C, as células foram lavadas e infectadas por mais 30 minutos com as três formas evolutivas do *T.cruzi*. Como podemos observar na Figura 21, mesmo após o tratamento com 20mM de metil β -ciclodextrina, os macrófagos sem parasita (Figuras 21 A e B), os macrófagos infectados com epimastigotas (Figuras 21 C e D) e os macrófagos infectados com amastigotas (Figuras 21 E e F) não mostraram fragmentação de núcleo (em vermelho) e, portanto, não estavam em apoptose. Esses resultados indicam que o tratamento com 20 mM de a metil β -ciclodextrina seguido de infecção por epimastigotas e amastigotas não induziu apoptose em macrófagos. Quando as células foram tratadas com a mesma concentração da droga mas infectadas com tripomastigotas, ficou claro o processo de apoptose (Figura 22). Nesse caso, as células tratadas que apresentavam tripomastigotas aderidos (Figuras 22 A, B, E e F - setas) mostraram positividade para apoptose, revelado pela coloração verde no

citoplasma, padrão que também foi observado em células com tripomastigotas internalizados seja em grande número (Figura 22s C e D-setas) ou apenas com uma parasita (Figuras 22 G e H - setas). É importante ressaltar que macrófagos tratados mas que não foram infectados por tripomastigotas presentes na mesma amostra que macrófagos infectados não apresentaram indícios de apoptose (Figuras 22 C e D – setas largas), se assemelhando ao padrão visto no controle (Figuras 21 A e B).

Para confirmar o resultado visto através da técnica de TUNEL, resolvemos buscar por outros marcadores de apoptose, como a exposição de fosfatidilserina na membrana de células em apoptose. Com o auxílio de um marcador específico para fosfatidilserina, a anexina V, utilizamos a análise por citometria de fluxo para determinar qual era a porcentagem de células que entravam em apoptose após o tratamento seguido de infecção por tripomastigotas (Figura 23). Os macrófagos usados como controle (Figura 23A) mostraram um pequeno percentual de células mortas (1,12 %) e de células em apoptose (1,5%), mas esses números foram maiores quando as células foram infectadas com tripomastigotas de *T. cruzi* (Figura 23 C), passando para 5,13% o percentual de células em apoptose. Quando as células são tratadas com 20mM de metil β -ciclodextrina, o percentual de células em apoptose foi maior, em relação ao controle, em 3,85% (Figura 23B), indicando que somente o tratamento com a droga já é capaz de disparar o mecanismo de apoptose em macrófagos. Após o processo de interação do *T. cruzi* com macrófagos tratados, os percentuais foram ainda maiores e o índice de apoptose chegou a 5,64% (Figura 23D), sendo o maior índice entre todos os pontos analisados. Esses resultados confirmam os dados observados através da técnica de TUNEL, ou seja, as células tratadas com 20 mM de metil β -ciclodextrina e infectadas com tripomastigotas entraram em apoptose em taxas mais altas que células somente tratadas com a

mesma concentração ou então tratadas e infectadas com outras formas evolutivas do parasita.

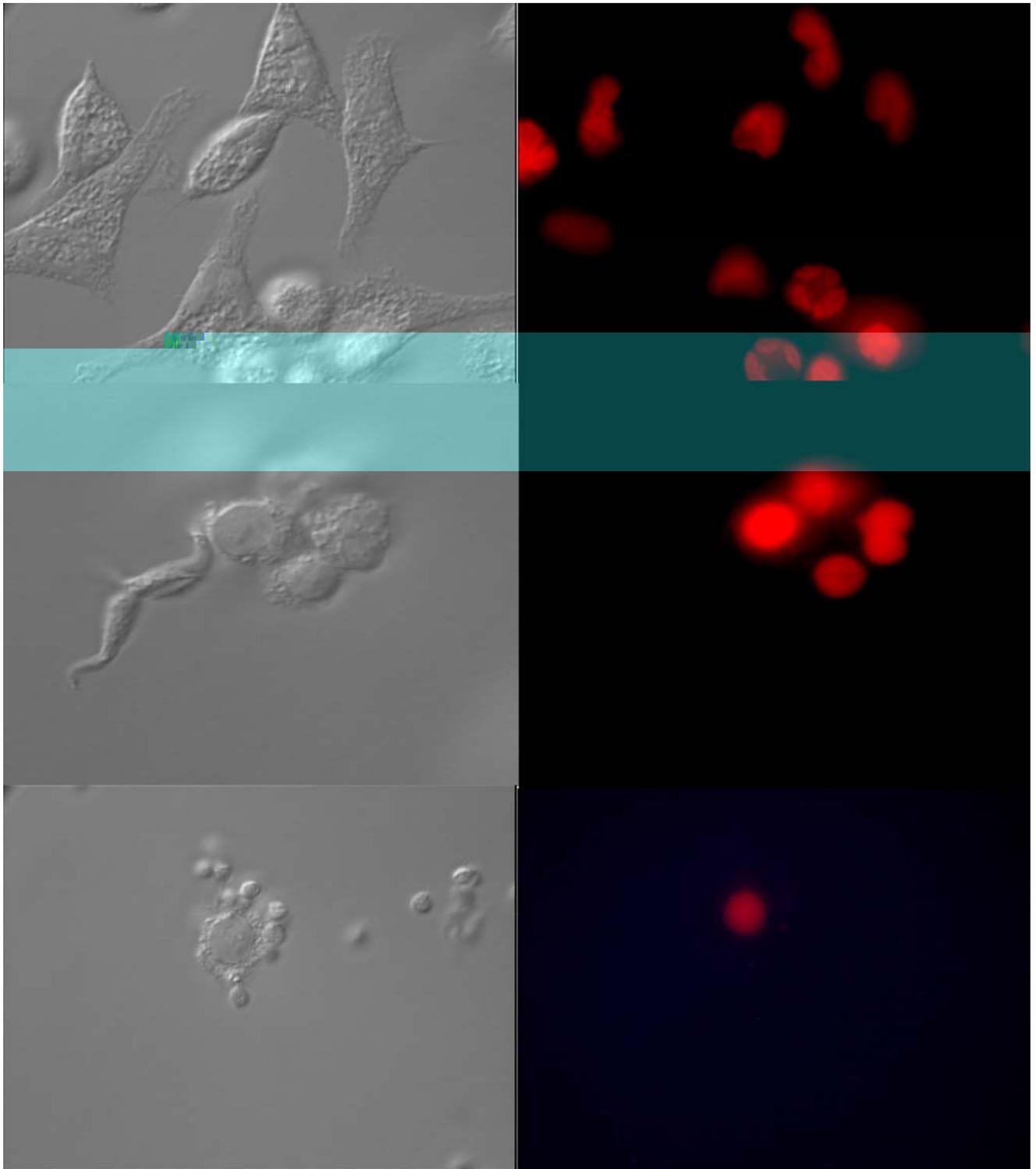


FIGURA 21: Microscopia de fluorescência com a técnica de TUNEL. Os macrófagos tratados com 20 mM de metil β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C, lavados para remover a droga (A - B) , infectados por mais 30 minutos a 37 °C com epimastigotas (C - D) ou amastigotas de *T.cruzi* (E - F). Após as interações, as amostras foram incubadas com os reagentes do kit TUNEL para revelar as células em apoptose (citoplasma verde – anti-BrdUTP) e células com o núcleo íntegro (marcação em vermelho-iodeto de propídeo). Detalhe ampliado mostrando uma forma tripomastigota dentro do vacúolo (I); epimastigota (cabeça de seta); amastigota (seta); núcleos íntegros (marcação em vermelho-iodeto de propídeo). A, C, E e G: contraste interferencial; B, D, F, H e I: fluorescência. Barra em A: 5 μ m; Barras em C e E: 10 μ m.

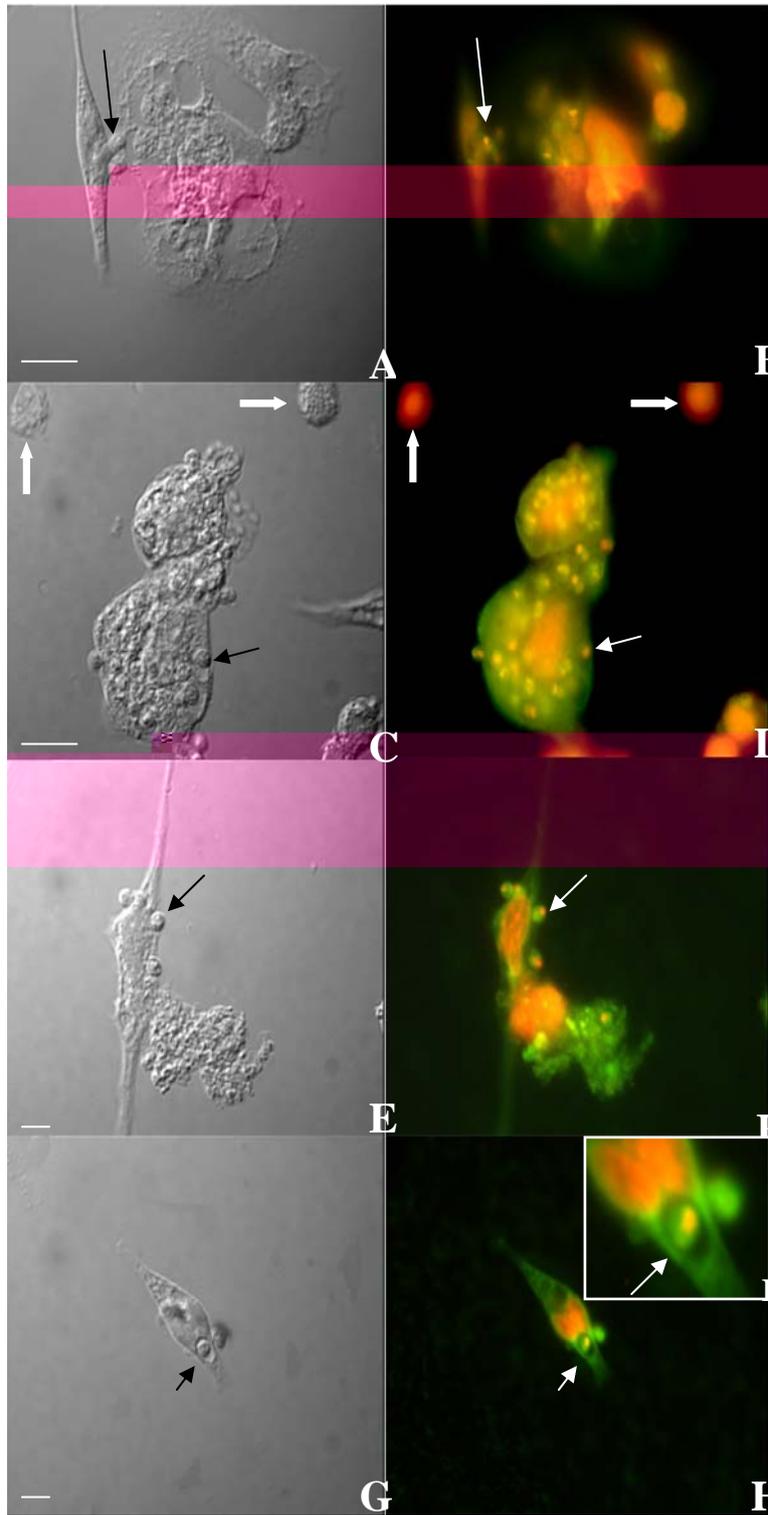


FIGURA 22: Microscopia de fluorescência com a técnica de TUNEL. Os macrófagos foram tratados com 20 mM de metil β -ciclodextrina durante 30 minutos a 37°C, lavados para remover a droga, infectados por mais 30 minutos a 37°C com tripomastigotas de *T.cruzi*. Após as interações, as amostras foram incubadas com os reagentes do kit TUNEL para revelar as células em apoptose (citoplasma verde – anti-BrdUTP) e células com o núcleo íntegro (marcação em vermelho-iodeto de propídeo). Barras em A e C: 10 μ m; Barras em E e G: 10 μ m. Tripomastigota (seta); células não-apoptóticas (setas largas).

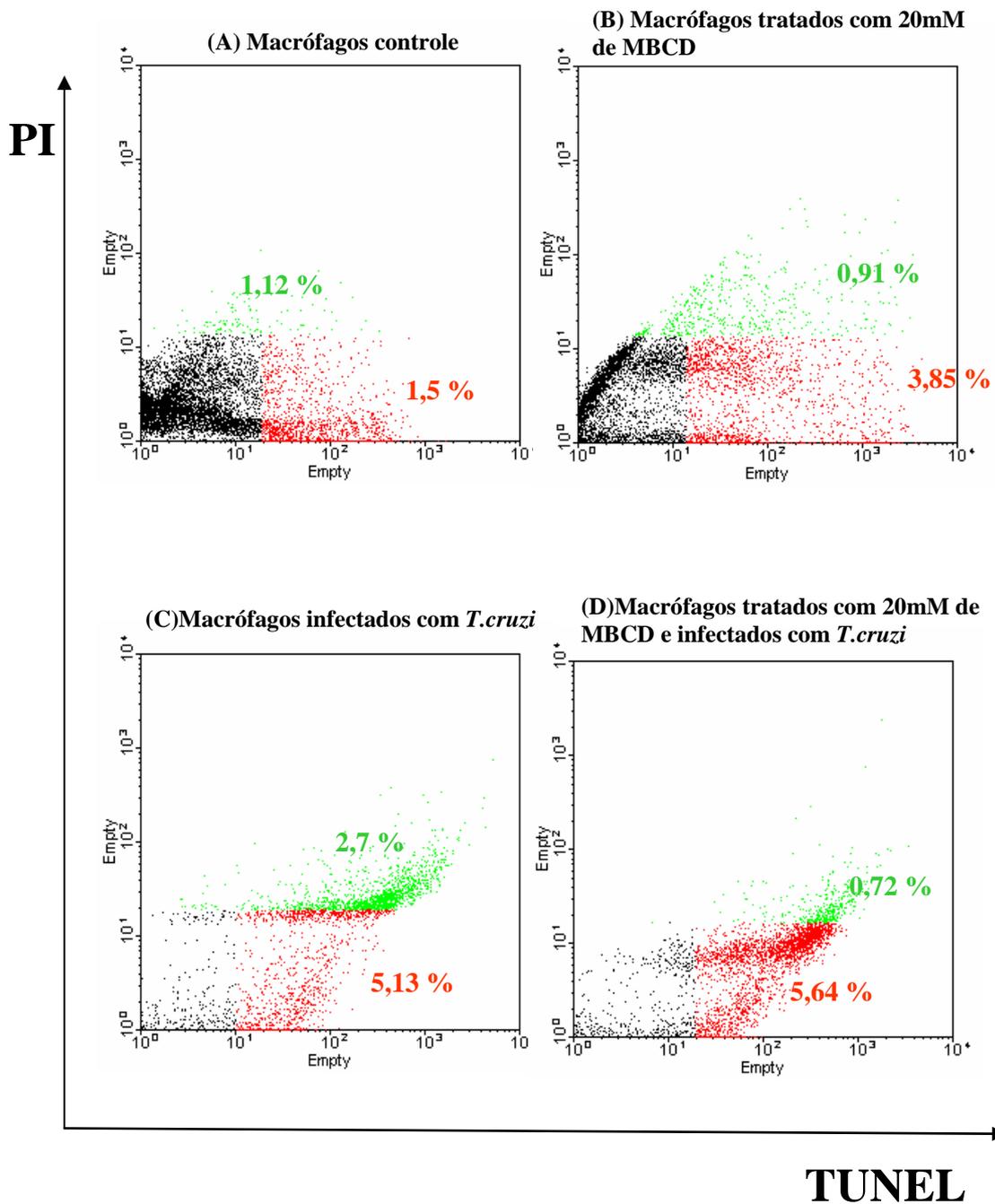


FIGURA 23: Exposição de fosfatidilserina em macrófagos tratados e infectados com tripomastigotas de *T.cruzi*. *Dot-plot* resultante da marcação com anexina – V FITC, obtido por análise em citometria de fluxo, mostrando a população de células mortas (verde) e de células em apoptose (vermelho) em macrófagos usados como controle (A), macrófagos tratados com 20 mM de metil β -ciclodextrina (B), macrófagos apenas

infectados com tripomastigotas (C) e macrófagos tratados e infectados (D). Células sem marcador (pontos pretos); células mortas (pontos verdes); células em apoptose (pontos vermelhos). Os índices percentuais assim como o dot-plot são resultados da média de dois experimentos.

5. Discussão

Diante dos resultados obtidos nesse estudo e baseado nas evidências relacionadas às vias de sinalização disparadas durante o processo de invasão do *T. cruzi* demonstradas em trabalhos anteriores do nosso grupo (Vieira; Carvalho; De Souza, 1994; Vieira *et al*, 2002), podemos concluir que a paxilina é mais uma proteína fosforilada durante o processo de invasão do parasita. Como sugerido por Vieira *et al*, 2002, seis peptídeos têm seus níveis de fosforilação em tirosina aumentados quando macrófagos são infectados com tripomastigotas. Esses peptídeos têm seu peso molecular muito similar a proteínas fosforiladas durante a fagocitose de outras moléculas (Aderem; Uderhill, 1999; Greenberg, 1999; Kwiatkowska; Sobota, 1999). Também foi sugerido, no mesmo estudo, que a banda de peso molecular de 67 kDa corresponderia a paxilina, mostrando um aumento na intensidade de fosforilação após a adesão de tripomastigotas na superfície de macrófagos. Nossos resultados confirmaram tal suspeita, mostrando que não só a paxilina é recrutada para o sítio de entrada do parasita assim como co-localiza com fosfotirosina e com F-actina.

Apesar da adesão de ligantes via integrinas ser classicamente ligada à fosforilação em tirosina da paxilina (Burrige; Turner; Romer, 1992) via ativação de FAK e Src quinases (Bellis; Miller; Turner, 1995 e Schaller; Parsons, 1995), fica claro que uma infinidade de ligantes que sinalizam através de receptores transmembrana

podem também levar a fosforilação de paxilina em resíduos de tirosina, o que nos sugere que no momento da adesão tripomastigotas possam atuar como ligantes para receptores transmembrana na superfície de células hospedeiras e disparar a cascata de sinalização para fosforilação da paxilina e o rearranjo do citoesqueleto, que culminaria na invasão da célula pelo parasita, processo já descrito para bactérias como *Campylobacter jejuni* (Monteville; Yoon; Konkel, 2003).

Além da *C.jejuni*, bactérias da espécie *Shigella flexneri* são capazes de invadir macrófagos da linhagem J774 através de um processo clássico de fagocitose (com formação de pseudópodes) com fosforilação em tirosina de uma série de proteínas, incluindo a paxilina (Kuwaie *et al*, 2001), mas, por outro lado, algumas espécies de bactérias como *Legionella pneumophila* são capazes de defosforilar a paxilina e a vinculina de protozoários da espécie *Hartmannella vermiformis* logo após a adesão na superfície do microorganismo, enquanto que o citoesqueleto não sofreu nenhuma alteração (Venkataraman; Kwaik, 2000; Venkataraman *et al*, 1998).

Burleigh; Andrews (1995a) sugerem que a resposta celular à invasão só ocorre após a despolimerização da rede cortical de actina. Essa hipótese foi confirmada mais tarde por Rodriguez *et al* (1995), que demonstraram que a ligação do parasito à superfície levava a um rearranjo do citoesqueleto, envolvendo a remoção dos filamentos de actina localizados na superfície da célula. Entretanto, Rosestolato *et al* (2002) utilizando diferentes tipos celulares (células fagocíticas e células não-fagocíticas), mostraram que existe uma redução na taxa de invasão do parasita após o tratamento da célula hospedeira com citocalasina, envolvendo, portanto, a participação do citoesqueleto da célula hospedeira.

A paxilina também mostrou um comportamento diferenciado diante dos diferentes tipos celulares usados nesse estudo. No caso da linhagem LLC-MK₂,

observamos uma co-localização de paxilina e F-actina ao redor do sítio de entrada do parasita. Já no caso de macrófagos existe também essa coincidência de marcações mais evidente em tripomastigotas já em processo de invasão. É interessante observar que células com habilidades fagocíticas diferentes como macrófagos e LLC-MK2 mostram certa coerência no padrão de marcação, entretanto, isso não acontece com os fibroblastos T-17. Quando analisamos as imagens da linhagem T-17 CPax, que teve a paxilina re-introduzida através de transfecção, o padrão de marcação para paxilina e F-actina tem mais coincidências com o padrão observado em macrófagos, apenas com uma redução na intensidade das marcações. Isso nos levou a sugerir que a via de sinalização que culmina com o recrutamento de actina e paxilina para o mesmo ponto de entrada parece ser orquestrado pelo mecanismo de adesão usado pelo tripomastigota, independente da capacidade fagocítica da célula.

Em relação aos resultados que mostram as células marcadas para paxilina e fosfotirosina, há uma inversão no padrão visto anteriormente. Nesse caso, macrófagos mostraram uma co-localização de paxilina e fosfotirosina, o que confirma a sugestão de Vieira *et al* (2002) de que a paxilina seria fosforilada em tirosina durante a invasão de tripomastigotas. Quando comparamos os resultados obtidos com as linhagens LLC-MK₂ e T-17 CPax notamos uma similaridade no padrão de marcação, ou seja, em células não fagocíticas profissionais observamos que não há uma coincidência de paxilina e fosfotirosina, sugerindo que nesses tipos celulares o mecanismo de invasão seja sinalizado por moléculas diferentes daquelas que atuam em macrófagos. É interessante observar o comportamento do fenótipo T-17 *-/-*. Nesse caso, não há marcação para paxilina, uma vez que essa célula não expressa a proteína, mas podemos observar a fosforilação em tirosina bem evidente no sítio de entrada do parasita. Mesmo com fenótipo knock-out para paxilina, esperávamos encontrar fosforilação no sítio de entrada

do parasita, já que a paxilina é apenas um dos seis alvos sugeridos anteriormente pelo nosso grupo como fosforilados durante a invasão. Dessa maneira vale ressaltar que os parasitas podem penetrar por vários processos, com ou sem a concentração de actina ao redor do parasita no sítio de entrada, ou seja, o *T. cruzi* pode invadir células através de vários mecanismos: (a) um processo tipicamente fagocítico envolvendo a formação de pseudópodos, dependente da polimerização dos filamentos de actina; (b) um processo endocítico que não depende da formação de pseudópodos, mas depende da polimerização de actina para internalização do parasita; (c) um processo endocítico que não depende da polimerização de actina (Rosestolato *et al*, 2002). Independente do mecanismo escolhido pelo parasita para invadir a células, a presença de paxilina parece ser fundamental para uma boa adesão e posterior internalização de tripomastigotas. Nossos resultados mostram que o fenótipo T-17 *-/-*, que não expressa paxilina, mostrou índices de adesão e internalização bem reduzidos quando comparados aos índices de linhagens que expressam paxilina constitutivamente como macrófagos, LLC-MK₂ e o próprio fenótipo T-17 CPax. Esse fenômeno se repetiu quando acompanhamos a progressão do ciclo intracelular do parasita até 96 horas após a invasão, onde o fenótipo *-/-* sucumbiu à infecção com apenas 72 horas, nos levando a sugerir que mesmo diante de uma pequena taxa de infecção o fenótipo *-/-* não suporta o ciclo até o final provavelmente por não conseguir suportar a expansão do volume celular. Sem a paxilina atuando nos pontos de adesão focal provavelmente ocorre a perda de adesão da célula infectada a medida que seu volume citoplasmático aumenta, fazendo com que a célula se solte do substrato e, conseqüentemente, morra. Vale ressaltar ainda que, excluindo o fenótipo *-/-*, macrófagos mostraram a mesma capacidade de suportar a infecção por 96 horas que linhagens não-fagocíticas profissionais, mesmo mostrando índices de internalização maiores que todas as linhagens usadas. Mais uma vez podemos

concluir que, assim como o parasita modula as diferentes vias de sinalização gerando diferentes mecanismos de entrada na célula, ele também é capaz de modular a taxa de sobrevivência no interior de células hospedeiras com capacidade fagocítica diferentes.

Estudos recentes mostram que o parasita é capaz de modular etapas da invasão que antes eram atribuídas à célula hospedeira. É o caso do mecanismo de escape do vacúolo, etapa crucial para o sucesso da invasão. Trabalhos anteriores mostravam que logo após o processo de invasão, quando a forma tripomastigota se encontra no interior do vacúolo parasitóforo, organelas do sistema endolisossomal da célula hospedeira aproximam-se do vacúolo e fundiam-se com ele, incorporando suas membranas à membrana do vacúolo parasitóforo e descarregando seu conteúdo no interior do vacúolo, que se torna ácido (Milder; Kloetzel; Deane, 1973; Nogueira; Cohn, 1976; Carvalho; De Souza, 1989, revisto em De Souza, 2005). Esse ambiente ácido é favorável à secreção pelo parasito de uma molécula tripsina-sensível, conhecida como Tc-Tox (Andrews, 1990), que tem a capacidade de, em ambiente ácido, incorporar-se à membrana do vacúolo parasitóforo, levando à sua lise. Entretanto, trabalhos mais recentes como o de Rubin-De-Celis *et al* (2006) mostrou-se que a lise da membrana do vacúolo e o posterior escape

eoro

conjunto com a célula hospedeira ou não, através de mecanismos ainda não totalmente elucidados.

Outro aspecto bastante relevante abordado foi o papel de microdomínios de membrana no processo de invasão de tripomastigotas de *T.cruzi*. Com o envolvimento de plataformas de membrana na entrada de patógenos como vírus, bactérias e protozoários (Fantini *et al*, 2002; Lafont; van der Goot, 2005; Pucadyl *et al*, 2004; Rodríguez *et al*, 2006) surgiu a necessidade de entender se essa via de entrada também era usada por tripomastigotas assim como definir a melhor maneira de bloqueá-la.

Na tentativa de bloquear a entrada via plataformas de membrana, o agente mais comumente usado para depletar colesterol de membranas e, conseqüentemente desorganizar as plataformas, é a metil β -ciclodextrina (MBCD), que atua retirando o colesterol de membranas além de reduzir processos endocíticos dependentes de cavéola. Metil β -ciclodextrina é um heptassacarídeo cíclico solúvel em água que se liga a colesterol com alta afinidade (Pitha *et al*, 1988). Colesterol de membranas plasmáticas de células em cultura é rapidamente removido em resposta ao tratamento com MBCD (Klein; Gimpl; Fahrenholz, 1995; Kilsdonk *et al*, 1995), dessa forma sendo exaustivamente usada como agente depletor de colesterol por sua maior afinidade e eficiência quando comparada a outras ciclodextrinas (Klein; Gimpl; Fahrenholz, 1995).. Os resultados mostram que macrófagos pré-tratados com MBCD e infectados com tripomastigotas mostraram drásticas alterações na morfologia, com o surgimento de grandes depressões de membrana, uma redução acentuada do número de filopódios e uma intensa liberação de membranas – *shedding*- causando o acúmulo de grumos amorfos na superfície da célula. Além disso, macrófagos tratados mostraram uma redução significativa na internalização do parasita, acompanhada de um aumento na adesão. Esses resultados nos levam a concluir que a falta de colesterol e a conseqüente

desorganização de plataformas de membrana afeta a dinâmica da membrana plasmática desta célula hospedeira, impedindo uma invasão bem sucedida por parte do parasita. Já no caso da infecção de células LLC-MK₂, houve uma inversão no perfil de inibição com uma redução brusca do índice de internalização na concentração mais baixa seguida de um aumento conforme aumentava a concentração da droga, mas sem que esse aumento atingisse os níveis vistos no controle. Parece que no caso de células não-fagocíticas profissionais existe uma “falsa indução”, ou seja, a droga parece facilitar a entrada em baixas concentrações, mas depois reverte isso para uma inibição de quase 10% na internalização seguido de um aumento de quase 25% na adesão do parasita. Resultados semelhantes foram descritos para a internalização de *Leishmania chagasi* por macrófagos (Rodríguez *et al*, 2006), onde cepas virulentas não foram capazes de invadir macrófagos tratados com MBCD, atuando de maneira semelhante a cepas atenuadas da mesma espécie.

Apesar de afetar a capacidade de macrófagos serem invadidos por tripomastigotas, ainda havia a dúvida se o reduzido número de parasitas que conseguiam entrar era capaz de sobreviver durante toda a fase intracelular do ciclo. Os resultados mostram que macrófagos pré-tratados e infectados com tripomastigotas tinham uma sobrevivência menor quanto mais alta era a concentração da droga, dados que coincidem com a redução dose-dependente da invasão citada anteriormente, ou seja, os poucos parasitas que conseguem invadir são responsáveis por uma baixa taxa de sobrevivência, chegando a uma redução de 80% no número de parasitas, ao final de 96 horas. Mesmo no caso de células LLC-MK₂ pré-tratadas e infectadas que mostraram uma “falsa indução”, os índices de sobrevivência também foram reduzidos cerca de 80% ao final de 96 horas. Em ambos os casos, mesmo repondo o colesterol após a

remoção pela ação da MBCD, não houve mudanças significativas na capacidade de sobrevivência dos parasitas.

Os resultados de Rodríguez *et al* (2006), sugerem a existência de duas vias de internalização: uma via é dependente das condições normais de plataformas de membrana e permite uma melhor sobrevivência do parasita e; uma segunda via que permite a invasão mesmo em células depletadas de colesterol, mas que leva a morte do parasita. Nossos resultados mostram que há uma redução na capacidade de invadir que é refletida em baixas taxas de infecção após 24, 48, 72 e 96 horas, ou seja, em células depletadas de colesterol ocorre uma baixa taxa de infecção mas não podemos afirmar que isso seja devido a morte do parasita.

Outro agente comumente utilizado para afetar a distribuição de colesterol e alterar a fluidez da membrana plasmática é a filipina, um é um antibiótico poliênico que atua como um ligante de colesterol que impede a invaginação para formação da cavéola inibindo, portanto, o processo endocítico baseado nessa estrutura. Nossos resultados mostram que a ação da filipina foi bastante controversa quando comparamos macrófagos e células LLC-MK₂ pré-tratadas com filipina e posteriormente infectadas com tripomastigotas. No caso de macrófagos, observamos uma redução dose-dependente tanto nos índices de adesão quanto no índice de internalização, sugerindo que a alteração estrutural causada na membrana pela ação da filipina não permite uma perfeita adesão e, conseqüentemente, uma baixa internalização. Já nas células LLC-MK₂, observamos uma redução da adesão justificada por um aumento na internalização, ou seja, a ação da filipina nesse caso parece reduzir a adesão pois aumenta a entrada do parasita. Estudos que mostram a ação da filipina durante a invasão de outros patógenos também são bastante controversos. No caso de protozoários como o *Plasmodium falciparum*, tratamentos com saponina e filipina não foram capazes de provocar a lise de

eritrócitos infectados enquanto outros antibióticos como anfotericina B e nistatina foram capazes de reduzir a infecção, causando a lise de eritrócitos infectados (Wiehart; Rautenbach; Hoppe, 2006). Já no caso da invasão de células intestinais pela bactéria *Campilobacter jejuni*, o tratamento com filipina reduziu em 99,9% a invasão das bactérias (Hu; McDaniel; Kopecko, 2006). Vale ressaltar que, mesmo após o tratamento com metil β -ciclodextrina ou filipina, não há dados na literatura que confirmem uma perda de viabilidade por parte das células hospedeiras.

Diante dos resultados controversos obtidos com o uso de agentes que interferem na distribuição do colesterol por membranas, decidimos procurar por uma localização de tripomastigotas em plataformas de membrana. Para isso utilizamos a subunidade B da toxina do *Cholera spp*, cuja afinidade pelo gangliosídeo GM1 – componente majoritário de plataformas de membrana - é muito bem caracterizada. Essa subunidade B da toxina se liga especificamente ao glicoesfingolípídeo GM1, no folheto externo de membranas, por exemplo, da membrana plasmática culminando com a internalização dessa subunidade feita por processos endocíticos dependentes de clatrina e cavéolas em vários tipos celulares estudados (Torgersen *et al*, 2001).

Após a incubação à 4°C de macrófagos com a toxina do cólera ligada a fluoresceína (CTB-FITC), notamos a distribuição de plataformas de membrana por toda extensão da membrana plasmática, padrão mantendo mesmo após a adição de tripomastigotas à cultura, ainda a 4°C. Por ser um marcador de GM1, localizado no folheto externo da membrana, optamos por manter nosso sistema à 4°C para reduzir a taxa constante de endocitose de macrófagos e, portanto, uma distribuição que não traduziria a real localização do gangliosídeo durante a adesão e internalização do parasita.

O gangliosídeo GM1 tem algumas características peculiares que são necessárias para que ele entre na formação de plataformas de membrana. Uma delas é a necessidade de que o sistema esteja funcionando à 37°C para que a fluidez da membrana permita o seu deslocamento até as regiões organizadas sob a forma de plataformas. Diante dessa característica, elevamos a temperatura da interação macrófago x tripomastigota para 37°C, mas não observamos nenhuma concentração do gangliosídeo GM1 (detectado pela fluorescência da toxina) ao redor de parasitas aderidos ou em processo de internalização. Esses resultados mostram mais indícios de que o processo de invasão não pode ser considerado padrão em todos os momentos, ou seja, não podemos afirmar que tripomastigotas de *T.cruzi* tenham preferência por entrar via plataformas de membrana somente diante do efeito de drogas que atuem sobre a distribuição de colesterol na membrana.

Outros trabalhos com patógenos mostram que existe uma concentração de GM1 ao redor do microorganismo (Duncan *et al*, 2004; Gabel *et al*, 2004; Parton; Richards, 2003), mas não podemos observamos tal concentração no caso do *Trypanosoma cruzi*. Para afirmar que não há uma preferência por plataformas de membrana no processo de invasão do parasita, será necessário testar outros tipos celulares além de macrófagos e outros marcadores como flotinina-1 e caveolina.

Uma característica muito peculiar e que nos chamou a atenção foi a morte celular precoce de células tratadas com 20 mM de a metil β-ciclodextrina e infectadas com tripomastigotas de *T.cruzi*. Para elucidar qual o processo que levava essas células à morte, decidimos buscar possíveis indícios de apoptose. Após observamos as células com auxílio da técnica de TUNEL, podemos concluir que somente as células infectadas com tripomastigotas mostravam-se positivas para o marcador de apoptose, revelado pela coloração verde no citoplasma das células infectadas. Isso nos leva a sugerir que o

mecanismo de apoptose disparado em células depletadas de colesterol é dependente de alguma molécula presente somente na superfície de tripomastigotas, adicionando uma forte suspeita de que o processo de invasão seja modulado mais por características do conjunto parasito-células do que somente pela natureza da célula a ser infectada. Além da apoptose detectada pela técnica de TUNEL, confirmamos nossos resultados com o auxílio da marcação por anexina-V, que se liga a resíduos de fosfatidilserina expostos na superfície de células em apoptose. Por citometria de fluxo podemos quantificar a taxa de apoptose disparada pela presença do parasita após o tratamento das células hospedeiras com a droga. Eventos de apoptose foram descritos em células endoteliais em processo de diferenciação após o tratamento com a mesma concentração (20 mM) de a metil β -ciclodextrina, sem que houvesse alterações morfológicas visíveis (Thyberg, 2002). No caso de queratinócitos, o tratamento com concentrações menores ainda (0,5%) disparou apoptose nas células, por um mecanismo que não afetava a permeabilidade da membrana nem o ciclo celular das células tratadas (Bang; Gniadecki; Gajkowska, 2005).

Apoptose causada por a metil β -ciclodextrina também vem sendo estudada como uma nova terapia no tratamento do câncer de pele. Nesse caso, o mecanismo de apoptose mediado por Fas (receptor de fator de necrose tumoral) é essencial contra o câncer de pele. Esse receptor foi localizado em plataformas de membrana e, após o tratamento com a metil β -ciclodextrina, esses receptores foram redistribuídos por toda a membrana e facilitaram a formação do complexo Fas-FADD (domínio protéico associado à morte induzida por Fas), que leva a ativação de caspase-8 e, conseqüentemente a apoptose. Essa exclusão do receptor Fas de plataformas de membrana pela ação da a metil β -ciclodextrina pode ser usada como um mecanismo de

indução de apoptose em células oncogênicas, agindo como uma terapia em potencial para o tratamento de outros tipos de câncer (Gniadecki, 2004).

Por outro lado, existem algumas moléculas que podem modular, chegando mesmo até a impedir, a apoptose disparada pela depleção de colesterol. Calleros *et al*, (2006) descreveram que a apoptose era acompanhada por um aumento na atividade de ERK, JNK e p38 MAP quinase. Entretanto, após a inibição da p38 MAP quinase por um inibidor específico, houve uma redução na apoptose e na clivagem de caspase-3 induzida pela depleção de colesterol. Além disso, a superexpressão de RhoA pelo mutante RhoAN19 inibe a fosforilação via p38MAP quinase e reduz a apoptose causada pela falta de colesterol nessas células. Outra evidência para identificar células em apoptose é a exposição de fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática. Ishii *et al*, (2005) mostraram que a organização de plataformas de membrana é drasticamente afetada em células em apoptose e que essa modificação é responsável pela exposição de fosfatidilserina pela célula, ou seja, a organização das plataformas parece ser um “marcador” de viabilidade da célula e, uma vez afetada, torna-se mais um mecanismo capaz de disparar apoptose.

No caso de apoptose disparada em macrófagos após o tratamento com a metil β -ciclodextrina e a infecção por tripomastigotas de *T.cruzi*, podemos sugerir que os mecanismos de sinalização disparados pelo tripomastigota após a adesão na membrana de macrófagos e que envolvem a fosforilação de proteínas já descrito por Vieira *et al*, (2002) esteja também modulando vias de sinalização intracelular envolvidas no disparo da apoptose. Essa sinalização, via tirosina quinase, disparada pelo tripomastigota seria possível somente diante de membranas “intactas”, ou seja, a desorganização de plataformas de membrana causada pela ação da metil β -ciclodextrina afeta a capacidade do macrófago de traduzir a sinalização disparada pelo

tripomastigota, reduzindo sua capacidade de internalizar o parasita. Além disso, a via de sinalização disparada pelo parasita e que resulta na fosforilação de proteínas, por exemplo a paxilina, é crucial para a entrada e sobrevivência do parasita. Uma vez que essa via é afetada pela desorganização da membrana dos macrófagos, pela ação da metil β -ciclodextrina a célula hospedeira entra em um processo de morte celular programada.

Diante de todos os resultados aqui apresentados, podemos sugerir que a atuação de proteínas fosforiladas após a adesão do *Trypanosoma cruzi* na superfície de células hospedeiras modula não só a entrada e sobrevivência do parasita como parece influenciar no disparo da apoptose diante da desorganização de plataformas de membrana. Esse mecanismo de apoptose da célula hospedeira pode contribuir para a disseminação silenciosa da doença de Chagas, silenciando a possibilidade de uma resposta inflamatória e, conseqüentemente, diminuindo as chances de reação do hospedeiro infectado.

6. Referências Bibliográficas

ABEDI, H.; ZACHARY, I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem.*, v.272, p.15442–15451, 1997.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* v. 17, p. 593-623, 1999.

AMER, A.O.; SWANSON, M.S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol.*, v.5, no.1, p.56-61, 2002.

ANDERSON, R.G. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* v.67, p.199-225, 1998.

ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med.*, v.200, no.9, p.1135-43, 2004.

ANDREWS, N.W. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J Cell Biol.*, v.58, no.3, p.389-94, 2002.

ANDREWS, N.W. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.*, v.71, no.2, p.241-4, 1990.

ANDREWS, N.W.; WHITLOW, M.B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol Biochem Parasitol* v.33, no.3, p. 249-56, 1989.

ARAÚJO-JORGE, T.C. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.84, no.4, p.441-62, 1989.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.87, no.5, p.43-56, 1992.

ARAÚJO- JORGE, T.C.; DE SOUZA, W. Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta Trop.*, v.41, no.1, p17-28, 1984.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages: effect of previous incubation of the parasites or the host cells with lectins. *Z Parasitenkd*, v.72, no.2, p.153-71, 1986.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Trop.*, v.45, no.2, p.127-36, 1988.

BAGNAT, M.; SIMONS, K. Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem.*, v.383, no.10, p.1475-80, 2002.

BANG, B.; GNIADOCKI, R.; GAJKOWSKA, B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.*, v.14, no.4, p.266-72, 2005.

BANNISTER, L.H.; MITCHELL, G.H. The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. *J Protozool.*, v.36, no.4, p.362-7, 1989.

BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Struct Funct.*, v.20, no.4, p.275-84, 1995.

BELLIS, S.L.; MILLER, J.T.; TURNER, C.E. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem.*, v.270, p.17437-17441, 1995.

BICKEL, P.E.; SCHERER, P.E.; SCHNITZER, J.E.; OH, P.; LISANTI, M.P.; LODISH, H.F. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem.*, v.272, no.21, p.13793-802, 1997.

BIRGE, R.B.; FAJARDO, J.E.; REICHMAN, C.; SHOELSON, S.E.; SONGYANG, Z.; CANTLEY, L.C.; HANAFUSA, H. Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Mol Cell Biol.*, v.13, p.4648-4656, 1993.

BOKOCH, G.M.; VLAHOS, C.J.; WANG, Y.; KNAUS, U.G.; TRAYNOR-KAPLAN, A.E. Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J.*, v.315, no.3, p.775-9, 1996.

BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol* v.106, p. 1349-1358, 1988.

BRACK, C. Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop.* v. 25, p. 289-356, 1968.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v.72, p.248-54, 1976.

BRANDÃO, A.; FERNANDES, O. *Trypanosoma cruzi*: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages T. cruzi I, T. cruzi II, and the Zymodeme III isolates. *Exp Parasitol.* v. 112, no.4, p. 247-52, 2006.

BRIONES, M.R.S.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol* v.104, p. 219, 1999.

BROWN, D.A.; ROSE, J.K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* v.68, p. 533–44, 1992.

BROWN, M.C.; TURNER, C.E. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* v.84, no. 4, p.1315-39, 2004.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Ann. Rev. Microbiol* v.49, p.175-200, 1995 (A).

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS N.W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem* v. 270, no.10, p.5172-80, 1995 (B).

BURLEIGH, B.A. Host Cell Signaling and *Trypanosoma cruzi* Invasion: Do All Roads Lead to Lysosomes? *Science* v.293, p.36, 2005.

BURRIDGE, K.; TURNER, C.E.; ROMER, L.H. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* v.119, p. 893–903, 1992.

BUTLER, A.A.; BLAKESLEY, V.A.; KOVAL, A.; DEJONG, R.; GROFFEN, J.; LEROITH, D. In vivo regulation of CrkII and CrkL proto-oncogenes in the uterus by insulin-like growth factor-I. Differential effects on tyrosine phosphorylation and association with paxillin. *J Biol Chem* v.272, p. 27660–27664, 1997.

CALER, E.V.; MORTY, R.E.; BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* v. 68, no.12, p. 6602-10, 2000.

CALLEROS, L.; LASA, M.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, F.J.; TORO, M.J.; CHILOECHES, A. RhoA and p38 MAPK mediate apoptosis induced by cellular cholesterol depletion. *Apoptosis.*, v.11, no.7, p.1161-73, 2006.

CAMARGO, E.P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic Trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, v.12, p.93-100, 1964.

CAMARGO, M.M.; ALMEIDA, I.C.; PEREIRA, M.E.; FERGUSON, M.A.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol.* v.158, no.12, p. 5890-901, 1997.

CAO, H.; SANGUINETTI, R.; MASTICK, C. Oxidative stress activates both Src-kinases and their negative regulator Csk and induces phosphorylation of two targeting proteins for Csk: caveolin-1 and paxillin. *Experimental Cell Research* v.294,p.159–171, 2004.

CARVALHO, T.M.; FERREIRA, A.G.; COIMBRA, E.S.; ROSESTOLATO, C.T.; DE SOUZA, W. Distribution of cytoskeletal structures and organelles of the host cell during evolution of the intracellular parasitism by *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol* v.31, no.3, p.325-33, 1999.

CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struc. Func.* v.14, p. 383-392, 1989.

CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* v.28, p. 205, 1986.

CASAMASSIMA, A.; ROZENGURT, E. Insulin-like growth factor I stimulates tyrosine phosphorylation of p130(Cas), focal adhesion kinase, and paxillin. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and formation of a p130(Cas) Crk complex. *J Biol Chem* v.273, p. 26149– 26156, 1998.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.1, n.2, p.159-218, 1909.

CHO, K.A.; RYU, S. J.; SIN, O.H.Y.; PARK, J. H.; LEE, J. W.; KIM, H.; KIM, K.T.; SOON, I.K.; PARK, S.C. Morphological Adjustment of Senescent Cells by Modulating Caveolin-1 Status. *J. Biol. Chem* v.279, no.40, p. 42270–42278, 2004.

CIAVAGLIA, M.DO.C; CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. *Biochem Biophys Res Commun* v.193, no.2, p.718-21, 1993.

COLLI, W.; ALVES, M.J. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, no. 1, p. 37-49, 1999.

CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother*, v.38, no.6, p.1041-7, 1996.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharm. Design* v.8, p. 211-231, 2002.

DE SOUZA, W. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. *Histochem Cell Biol.*, v.123, no. 1, p.1-18, 2005.

DEL POZO, M.A.; ALDERSON, N.B.; KIOSSES, W.B.; CHIANG, H.H.; ANDERSON, R.G.; SCHWARTZ, M.A. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* v.303,p. 839–842, 2004.

DERMINE, J.F.; DUCLOS, S.; GARIN, J.; ST-LOUIS, F.; REA, S.; PARTON, R.G.; DESJARDINS, M. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. *J Biol Chem* v. 276, p.18507–18512, 2001.

DERMINE, J.F.; SCIANIMANICO, S.; PRIVE, C.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* v.2, p.115–126, 2000.

DIETRICH, C.; BAGATOLLI, L.A.; VOLOVYK, Z.N.; THOMPSON, N.L.; LEVI, M.; JACOBSON, K.; GRATTON, E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys. J.* v.80, p.1417–28, 2001.

DIETRICH, C.; YANG, B.; FUJIWARA, T.; KUSUMI, A.; JACOBSON, K. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys. J.* v.82, p.274–84, 2002.

DIETZEN, D.J.; HASTINGS, W.R.; LUBLIN, D.M. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem*, v.270, p. 6838–6842, 1995.

DORTA, M.L.; FERREIRA, A.T.; OSHIRO, M.E.; YOSHIDA, N. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol*, v.73, nos.1-2, p. 285-9, 1995.

DUNCAN, M.J.; LI, G.; SHIN, J.S.; CARSON, J.L.; ABRAHAM, S.N. Bacterial Penetration of Bladder Epithelium through Lipid Rafts. *J. Biol. Chem* v. 279, no. 18, p. 18944–18951, 2004.

DUNCAN, M.J.; SHIN, J.S.; ABRAHAM, S.N. Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell Microbiol*, v.4, no.12, p. 783-91, 2002.

DUPREE, P.; PARTON, R.G.; RAPOSO, G.; KURZCHALIA, T.V.; SIMONS, K. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J*, v.12, p.1597–1605, 1993.

DUTRA, J.M.F. O Papel da fosfadilinositol 3-quinase (PI3quinase) em células de mamíferos infectadas por *Trypanosoma cruzi*. Monografia submetida ao Instituto de Biologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Agosto de 2000.

DUTRA, J.M.F; BONILHA, V.L.; DE SOUZA, W.; CAVALHO, T.M.U. Role of small GTPases in *Trypanosoma cruzi* invasion in MDCK cell lines. *Parasitol Res.*, v.96, no.3, p.171-7, 2005.

DVORAK, J.A.; SCHMUNIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*: interaction with mouse peritoneal macrophages. *Exp Parasitol* v.32, no.2, p.289-300, 1972.

ELLERBROEK, S.M.; WENNERBER, G. K.; BURRIDGE, K. Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem* v.278, p. 19023–19031, 2003.

EPAND, R.M. Do proteins facilitate the formation of cholesterol-rich domains? *Biochim. Biophys. Acta* v.1666, p.227–38, 2004.

FANTINI, J.; GARMY, N.; MAHFOUD, R.; YAHY, N. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert reviews in molecular medicine*, no.20, 2002.

FERNANDES, A.B.; MORTARA, R.A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic

trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. *Microbes Infect*, v.6, no.5, p. 460-7, 2004.

FERNANDES, A.B.; NEIRA, I.; FERREIRA, A.T.; MORTARA, R.A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. *Parasitol. Res.* (2006). [In Press]

FERNANDES, O.; SOUTO, R.P.; CASTRO, J.A.; PEREIRA, J.B.; FERNANDES, N.C.; JUNQUEIRA, A.C.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* v.58, no.6, p.807-11, 1998.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. A nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v.76, p. 293-297, 1982.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.81, no.5, p.755-9, 1987.

FIVAZ, M.; VILBOIS, F.; THURNHEER, S.; PASQUALI, C.; ABRAMI, L.; BICKEL, P.E.; PARTON, R.G.; VAN DER GOOT, F.G. Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *EMBO J*, v.21, p.3989–4000, 2002.

FREITAS, J.M.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol.* v.35, p. 411–417, 2005.

FUJIMOTO, T.; KOGO, H.; NOMURA, R.; UNE, T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci.*, v.113, no.19, p.3509-17, 2000.

FUJITA, H.; KAMIGUCHI, K.; CHO, D.; SHIBANUMA, M.; MORIMOTO, C.; TACHIBANA, K. Interaction of Hic-5, a senescence-related protein, with focal adhesion kinase. *J Biol Chem* v.273, p. 26516–26521, 1998.

GABEL, B.R.; ELWELL, C.; VAN IJZENDOORN, S.C.; ENGEL, J.N. Lipid raft-mediated entry is not required for *Chlamydia trachomatis* infection of cultured epithelial cells. *Infect Immun.*, v.72, no.12, p.7367-73, 2004.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. *Parasitol. Today* v.7, p.240, 1991.

GARCIA, L.J.; ROSADO, J.A.; GONZALEZ, A.; JENSEN, R.T. Cholecystokinin-stimulated tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin is mediated by phospholipase C-dependent and -independent mechanisms and requires the integrity of the actin cytoskeleton and participation of p21rho. *Biochem J*, v.327, p. 461–472, 1997.

GARIN, J.; DIEZ, R.; KIEFFER, S.; DERMINE, J.F.; DUCLOS, S.; GAGNON, E.; SADOUL, R.; RONDEAU, C.; DESJARDINS, M. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol*, v.152, p.165–180, 2001.

GATFIELD, J.; PIETERS, J. Essential role for cholesterol in entry of *Mycobacteria* into macrophages. *Science*. v.288, no.5471, p.1647-50, 2000.

GAUS, K.; GRATTON, E.; KABLE, E.P.; JONES, A.S.; GELISSEN, I.; KRITHARIDES, L.; JESSUP, W. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.100, p.15554–59, 2003.

GAZZINELLI, R.T.; CAMARGO, M.M.; ALMEIDA, I.C.; MORITA, Y.S.; GIRALDO, M.; ACOSTA-SERRANO, A.; HIENY, S.; ENGLUND, P.T.; FERGUSON, M.A.; TRAVASSOS, L.R.; SHER, A. Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages. *Chem Immunol.*, v.68, p.136-52, 1997.

GHOSH, P.K.; VASANJI, A.; MURUGESAN, G.; EPPELL, S.J.; GRAHAM, L.M.; FOX, P.L. Membrane microviscosity regulates endothelial cell motility. *Nat. Cell Biol*, v.4, p.894–900, 2002.

GLENNEY, J.J.; SOPPET, D. Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.89, no.21, p.10517-21, 1992.

GLENNEY, J.J.; ZOKAS, L. Novel tyrosine kinase substrates from *Rous* sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J Cell Biol* v.108, p. 2401–2408, 1989.

GNIADOCKI, R. Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.320, no.1, p.165-9, 2004.

GOMEZ-MOUTON, C.; ABAD, J.L.; MIRA, E.; LACALLE, R.A.; GALLARDO, E.; JIMENEZ-BARANDA, S.; ILLA, I.; BERNARD, A.; MANES, S.; MARTINEZ-A, C. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci* v.98, no.17, p.9642-7, 2001.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENER, S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp Parasitol* v.66, p. 205-212, 1988.

GREENBERG, S. Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol* v.66, no.5, p.712-7,1999.

GUVAKOVA, M.A.; SURMACZ, E. The activated insulin-like growth factor I receptor induces depolarization in breast epithelial cells characterized by actin filament disassembly and tyrosine dephosphorylation of FAK, Cas, and paxillin. *Exp Cell Res* v.251, p. 244–255, 1999.

HALL, B.S.; PEREIRA, M.A. Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect Immun.* v.68, no.4, p.2077-81, 2000.

HAN, J.D.; RUBIN, C.S. Regulation of cytoskeleton organization and paxillin dephosphorylation by cAMP. Studies on murine Y1 adrenal cells. *J Biol Chem* v.271, p. 29211–29215, 1996.

HEAD, B.P.; HEMAL, H.; ROTH, D.M.; MURRAY, F.; SWANEY, J.S.; INGRID, R. Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J Biol Chem*, 2006. [In Press]

HEIJNEN, H.F.; VAN LIER, M.; WAAIJENBORG, S.; OHNO-IWASHITA, Y.; WAHEED, A.A.; INOMATA, M.; GORTER, G.; MOBIUS, W.; AKKERMAN, J.W.; SLOT, J.W. Concentration of rafts in platelet filopodia correlates with recruitment of c-Src and CD63 to these domains. *J. Thromb. Haemost.*, v.1, p.1161–73, 2003.

HERRERA, R.E. The growth-inhibitory effects of TGF beta. *Prog Mol Subcell Biol* v.20, p.11-24, 1998.

HILLER, N. L.; AKOMPONG, T.; MORROW, J.S.; HOLDER, A.; KASTURI, H. Identification of a Stomatin Orthologue in Vacuoles Induced in Human Erythrocytes by malaria Parasites. A role for microbial raft proteins in apicomplexan biogenesis. *J Biol. Chem* v.278, no.48, p.48413-48421, 2003.

HOARE, C.A. Morphological and Taxonomic studies on mammalian Trypanosomes. X revision of the systematics. *J Protozool* p. 200-7, 1964.

HOOPER, N.M. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol. Membr. Biol* v.16, p.145–156, 1999.

HOWE, A.K.; JULIANO, R.L. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* v.2, p. 593–600, 2000.

HU, L.; MCDANIEL, JP.; KOPECKO, D.J. Signal transduction events involved in human epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog.*, v.40, no.3, p.91-100, 2006.

ISHII, H.; MORI, T.; SHIRATSUCHI, A.; NAKAI, Y.; SHIMADA, Y.; OHNO-IWASHITA, Y.; NAKANISHI, Y. Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.327, no.1, p.94-9, 2005.

ISHIKI, M.; SASAOKA, T.; ISHIHARA, H.; IMAMURA, T.; USUI, I.; TAKATA, Y.; KOBAYASHI, M. Evidence for functional roles of Crk-II in insulin and epidermal growth factor signaling in Rat-1 fibroblasts overexpressing insulin receptors. *Endocrinology* v.138, p. 4950–4958, 1997.

ITO, A.; KATAOKA, T.R.; WATANABE, M.; NISHIYAMA, K.; MAZAKI, Y.; SABE, H.; KITAMURA, Y.; NOJIMA, H. A truncated isoform of the PP2A B56 subunit promotes cell motility through paxillin phosphorylation. *EMBO J* v.19, no.4, p.562-71, 2000.

JUNQUEIRA, A.C.V.; DEGRAVES, W.; BRANDAO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *TRENDS Parasitol.*, v.21, no.6, p.270-3, 2005.

KABOURIDIS, P.S.; JANZEN, J.; MAGEE, A.L.; LEY, S.C. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol* p.954–963, 2000.

KENWORTHY, A.K.; NICHOLS, B.J.; REMMERT, C.L.; HENDRIX, G.M.; KUMAR, M.; ZIMMERBERG, J.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J. Cell Biol* v.165, p.735–46, 2004.

KENWORTHY, A.K.; PETRANOVA, N.; EDIDIN, M. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. *Mol. Biol. Cell* v.11, p.1645–55, 2000.

KHAN, T.K.; YANG, B.; THOMPSON, N.L.; MAEKAWA, S.; EPAND, R.M.; JACOBSON, K. Binding of NAP-22, a calmodulin-binding neuronal protein, to raft-like domains in model membranes. *Biochemistry* v.42, p.4780–86, 2003.

KILSDONK, E.P.C.; YANCEY, P.G.; STOUTD, G.W.; BANGERTER, F.W.; JOHNSON, W.J.; PHILLIPS, M.C. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* v.270, p. 17250–6, 1995.

KIPNIS, T.L.; CALICH, V.L.; DA SILVA, W.D. Active entry of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* into macrophages. *Parasitology* v.78, no.1, p.89-98, 1979.

KLEIN, U., GIMPL, G., AND FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with b-cyclodextrins modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* v.34, p. 13784–13793, 1995.

KOLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. *Parasitol Today* v.16, p.381, 2000.

KONSTANTOPOULOS, N.; CLARK, S. Insulin and insulin-like growth factor-1 stimulate dephosphorylation of paxillin in parallel with focal adhesion kinase. *Biochem J* v.314, no.2, p.387-90, 1996.

KORLACH, J.; SCHWILLE, P.; WEBB, W.W.; FEIGENSON, G.W. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.96, p.8461–66, 1999.

KRUTH, H.S.; IFRIM, I.; CHANG, J.; ADDADI, L.; PERL-TREVES, D.; ZHANG, W.Y. Monoclonal antibody detection of plasma membrane cholesterol microdomains responsive to cholesterol trafficking. *J. Lipid Res* v.42, p.1492–500, 2001.

KURZCHALIA, T.V.; DUPREE, P.; PARTON, R.G.; KELLNER, R.; VIRTA, H.; LEHNERT, M.; SIMONS, K. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral

component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J Cell Biol* v.118, p.1003–1014, 1992.

KURZCHALIA, T.V.; PARTON, R.G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol.*, v.11, no.4, p.424-31, 1999.

KUWAE, A.; YOSHIDA, S.; TAMANO, K.; MIMURO, H.; SUZUKI, T.; SASAKAWA, C. *Shigella* Invasion of Macrophage Requires the Insertion of IpaC into the Host Plasma Membrane - FUNCTIONAL ANALYSIS OF IpaC. *J. Biol. Chem* v. 276, no.34, p. 32230–32239, 2001.

KWIATKOWSKA, K.; SOBOTA, A. Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation controls capping of Fcγ receptor II in U937 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* v.42, no.4, p.298-314,1999.

LAFONT, F. ;VAN DER GOOT, F.G. Oiling the key hole. *Molecular Microbiology* v.56, no.3, p. 575–577, 2005.

LAFONT, F.; VERKADE, P.; GALLI, T.; WIMMER, C.; LOUVARD, D.; SIMONS, K. Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.96, no.7, p.3734-8, 1999.

LAGERHOLM, B.C.; WEINREB, G.E.; JACOBSON, K.; THOMPSON, N.L. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu Rev Phys Chem.*, v.56, p.309-36, 2005.

LEEB-LUNDBERG, L.M.; SONG, X.H.; MATHIS, S.A. Focal adhesion-associated proteins p125FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *Biol Chem* v.269, no.39, p.24328-34, 1994.

LEVENTHAL, P.S.; SHELDEN, E.A.; KIM, B.; FELDMAN, E.L. Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin- like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *J Biol Chem* v.272, p. 5214–5218, 1997.

- LEY, V.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N.W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med* v.171, no.2, p.401-13, 1990.
- LI, S.; COUET, J.; LISANTI, M. P. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem* v.271,p. 29182-29190, 1996.
- LIPSKY, B.P.; BEALS, C.R.; STAUNTON, D.E. Leupaxin is a novel LIM domain protein that forms a complex with PYK2. *J Biol Chem* v.273, p. 11709–11713, 1998.
- LOMMERSE, P.H.; BLAB, G.A.; COGNET, L.; HARMS, G.S.; SNAAR-JAGALSKA, B.E.; SPAINK, H.P.; SCHMIDT, T. Single-molecule imaging of the H-ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. *Biophys. J* v.86, p.609–16, 2004.
- LOURA, L.M.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. Exclusion of a cholesterol analog from the cholesterol-rich phase in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* v.1511, p.236–43, 2001.
- MADORE, N.; SMITH, K.L.; GRAHAM, C.H.; JEN, A.; BRADY, K. ;HALL , S.; MORRIS, R. Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J* v. 18,p. 6917–6926, 1999.
- MAGDESIAN, M.H.; GIORDANO, R.; ULRICH, H.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, R.I.; COLLI, W.; ALVES, M.J. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *J Biol Chem* v. 276, no.22, p.19382-9, 2001.
- MAGEE, A.I. Cell adhesion molecules and intracellular signalling: from fly to man. *Cell Signal*, v.7, no. 3, p.165-70, 1995.

MALAGA-TRILLO, E.; LAESSING, U.; LANG, D.M.; MEYER, A.; STUERMER, C.A. Evolution of Duplicated reggie Genes in Zebrafish and Goldfish. *J Mol Evol.*, v.54, no.2, p.235-45, 2002.

MAÑES, S.; MARTINEZ-A, C. Cholesterol domains regulate the actin cytoskeleton at the leading edge of moving cells. *Trends Cell Biol.*, v.14, no.6, p.275-8, 2004.

MAÑES, S.; MIRA, E.; GOMEZ-MOUTON, C.; LACALLE, R.A.; KELLER, P.; LLABRADOR, J.P.; MARTINEZ-A, C. Membrane raft microdomains mediate front–rear polarity in migrating cells. *EMBO J* v. 18 ,p. 6211–6220, 1999.

MAÑES, S.; ANA LACALLE, R.; GOMEZ-MOUTON, C.; MARTINEZ-A, C. From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends Immunol* v.24,p. 320–326, 2003.

MATSUYA, M.; SASAKI, H.; AOTO, H.; MITAKA, T.; NAGURA, K.; OHBA, T.; ISHINO, M.; TAKAHASHI, S.;SUZUKI, R.; SASAKI, T. Cell adhesion kinase beta forms a complex with a new member, Hic-5, of proteins localized at focal adhesions. *J Biol Chem* v.273, p. 1003–1014, 1998.

MAZAKI, Y.; HASHIMOTO, S.; SABE, H. Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins. *J Biol Chem* v.272, p. 7437–7444, 1997.

MAZAKI, Y.; UCHIDA, H.; HINO, O.; HASHIMOTO, S.; SABE, H. Paxillin isoforms in mouse. Lack of the gamma isoform and developmentally specific beta isoform expression. *J Biol Chem* v.273, p. 22435– 22441, 1998.

MEIRELLES, M.N.; DE SOUZA, W. The fate of plasma membrane macrophage enzyme markers during endocytosis of *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol.*, v.18, no.1, p.99-107, 1986.

MELAMED, I.; TURNER, C.E.; AKTORIES, K.; KAPLAN, D.R.; GELFAND, E.W. Nerve growth factor triggers microfilament assembly and paxillin phosphorylation in human B lymphocytes. *J Exp Med* v.181, p. 1071–1079, 1995.

MIAO, H.; BURNETT, E.; KINCH, M.; SIMON, E.; WANG, B. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol* v.2, no.2, p.62-9, 2000.

MILDER, R.V.; KLOETZEL, J.; DEANE, M.P. Observation of the interaction of peritoneal macrophages with *Trypanosoma cruzi*. I. Initial phase of the relationship with blood stream and culture forms in vitro. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v.15, no.6, p.386-92, 1973.

MING, M.; EWEN, M.E.; PEREIRA, M.E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*, v.82, no.2, p.287-96, 1995.

MONIER, S.; PARTON, R.G.; VOGEL, F.; BEHLKE, J.; HENSKE, A.; KURZCHALIA, T.V. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* v.6, p.911–927, 1995.

MONTEVILLE, M.R.; YOON, J.E.; KONKEL, M.E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* v.149, no.1, p.153-65, 2003.

MORENO, S.N.; SILVA, J.; VERCESI, A.E.; DOCAMPO, R. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J Exp Med*. v.180, no.4, p.1535-40, 1994.

MORGENSTERN, J.P.; LAND, H. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res.*, v.18, no.4, p.1068, 1990

MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol.* v.73, p. 1-14, 1991.

MUKHERJEE, S.; ZHA, X.; TABAS, I.; MAXFIELD, F.R. Cholesterol distribution in living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent cholesterol analog. *Biophys. J* v.75, p.1915–25, 1998.

NIV, H.; GUTMAN, O.; HENIS, Y.I.; KLOOG, Y. Membrane interactions of a constitutively active GFP-Ki-Ras 4B and their role in signaling. Evidence from lateral mobility studies. *J. Biol. Chem* v.274, p.1606–13, 1999.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine* v.143, no.6, p.1402-20, 1976.

NORES, G.A.; DOHI, T.; TANIGUCHI, M.; HAKOMORI, S. Density-dependent recognition of cell surface GM3 by a certain anti-melanoma antibody, and GM3 lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen. *J. Immunol* v.139, p.3171–76, 1987.

OSADA, M.; OHMORI, T.; YATOMI, Y.; SATOH, K.; HOSOGAYA, S.; OZAKI, Y. Involvement of Hic-5 in platelet activation: integrin alphaIIb beta3- dependent tyrosine phosphorylation and association with proline-rich tyrosine kinase 2. *Biochem J* v.355, p. 691–697, 2001.

OSTERMEYER, A.G.; BECKRICH, B.T.; IVARSON, K.A.; GROVE, K.E.; BROWN, D.A. Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. *J. Biol. Chem* v. 274, p. 34459–34466, 1999.

PARPAL, S; KARLSSON, M; THORN, H; STRALFORS, P. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem* v.276, p. 9670–9678, 2001.

PARTON, R.G. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.*, v.8, no.4, p.542-8, 1996.

PARTON, R.G.; RICHARDS, A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic.*, v.4, no.11, p.724-38, 2003.

PEREIRA, M.E.; ZHANG, K.; GONG, Y.; HERRERA, E.M.; MING, M. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. *Infect Immun* v.64, no.9, p.3884-92, 1996.

PITHA, J.; IRIE, T.; SKLAR, P.B.; NYE, J.S. Drug solubilizers to aid pharmacologists; amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci* v.43, p. 493–502, 1988.

PRALLE, A.; KELLER, P.; FLORIN, E.L.; SIMONS, K.; HORBER, J.K. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol* v.148, p. 997–1007, 2000.

PROCOPIO, D.O.; DA SILVA, S.; CUNNINGHAM, C.C.; MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol.*, v.90, no.1, p.1-13, 1998.

PUCADYIL, T.J.; TEW,ARY P.; MADHUBALA, R.;CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. *Molecular & Biochemical Parasitology* v.133, p. 145–152, 2004.

RAMEH, L.E.; CANTLEY, L.C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* v.274, no.13, p.8347-50, 1999.

RANKIN, S.; HOOSHMAND-RAD, R.; CLAEISSON-WELSH, L.; ROZENGURT, E. Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase activity in platelet-derived growth factor-stimulated tyrosine phosphorylation of p125 focal adhesion kinase and paxillin. *J Biol Chem* 271: 7829–7834, 1996.

RIEDY, M.C.; BROWN, M.C.; MOLLOY, C.J.; TURNER, C.E. Activin A and TGF-beta stimulate phosphorylation of focal adhesion proteins and cytoskeletal

reorganization in rat aortic smooth muscle cells. *Exp Cell Res.*, v.251, no.1, p.194-202, 1999.

RODAL, S.K.; SKRETTING, G.; GARRED, O.; VILHARDT, F.; VAN DEURS, B.; SANDVIG, K. Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* v.10, p. 961–974, 1999.

RODRIGUEZ, A.; RIOULT, M.G.; ORA, A.; ANDREWS, N.W. A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* v.129, no.5, p.1263-73, 1995.

RODRIGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M.G.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* v.134, p. 349-362, 1996.

RODRIGUEZ, N.E.; GAUR, U.; WILSON, M.E. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. *Cellular Microbiology* v.8, no.7, p.1106-20, 2006.

ROHDE, M.; MÜLLER, E.; CHHATWAL, G.S.; TALAY, S.R. Host cell caveolae act as an entry-port for Group A streptococci. *Cellular Microbiology* v.5, p. 323–342, 2003.

ROSESTOLATO, C.T.; DUTRA, J.M.F.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct* v.27, no.2, p. 91-8, 2002.

ROZENGURT, E. Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv* v.24, p.81-96, 1995.

RUBIN-DE-CELIS, S.; UEMURA, H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN, S. Expression of trypomastigote *Trans*-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cellular Microbiology*, 2006. [In Press]

RYU, H.; LEE, J.H.; KIM, K.S.; JEONG, S.M.; KIM, P.H.; CHUNG, H.T. Regulation of neutrophil adhesion by pituitary growth hormone accompanies tyrosine phosphorylation of Jak2, p125FAK, and paxillin. *J Immunol* v.165, p. 2116–2123, 2000.

SALGIA, R.; UEMURA, N.; OKUDA, K.; LI, J.L.; PISICK, E.; SATTLER, M.; DE JONG, R.; DRUKER, B.; HEISTERKAMP, N.; CHEN, L.B. CRKL links p210BCR/ABL with paxillin in chronic myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* v.270, p. 29145–29150, 1995.

SANTORI, F.R.; DORTA, M.L.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; DA SILVEIRA, J.F.; RUIZ, R.C.; YOSHIDA, N. Identification of a domain of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 required for attachment and invasion of mammalian cells. *Mol Biochem Parasitol* v.78, no.1-2, p.209-16, 1996.

SARGIACOMO, M.; SUDOL, M.; TANG, Z.; LISANTI, M.P. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* v.122, p.789–807, 1993.

SATO, S.B.; ISHII, K.; MAKINO, A.; IWABUCHI, K.; YAMAJI-HASEGAWA, A.; SENOH, Y.; NAGAOKA, I.; SAKURABA, H.; KOBAYASHI, T. Distribution and transport of cholesterol-rich membrane domains monitored by a membrane-impermeant fluorescent polyethylene glycol-derivatized cholesterol. *J. Biol.Chem* v.279, p.23790–96, 2004.

SCHALLER, M.D.; PARSONS, J.T. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol* v.15, p. 2635–2645, 1995.

SCHALLER, M.D. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* v.20, p. 6459–6472, 2001.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.; LIMA, A.P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by

Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med* v.192, no.9, p.1289-300, 2000.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today* v.9, no.6, p.218-22, 1993.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M.S.; HART, G.W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* v.65, no.7, p.1117-25, 1991 (A).

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R.A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Cell Sci.*, v.101, no.4, p.895-905, 1992.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect Immun* v.59, no.2, p.645-54, 1991.

SCHERER, P. E.; TANG, Z.; CHUN, M.; SARGIACOMO, M.; LODISH, H. F.; LISANTI, M. P. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem* v.270, p. 16395-16401, 1995.

SCHMIDT, J.; KLEMMANN, T.; SCHAUB, G.A Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. *Parasitol. Res* v.84, p. 527-536, 1998.

SCHULTE, T.; PASCHKE, K.A.; LAESSING, U.; LOTTSPREICH, F.; STUERMER, C.A. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development.*, v.124, no.2, p.577-87, 1997.

SCHUTZ, G.J.; KADA, G.; PASTUSHENKO, V.; SCHINDLER, H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J* v.19, p.892-901, 2000.

SCOTT, G.; LIANG, H.; LUTHRA, D. Stem cell factor regulates the melanocyte cytoskeleton. *Pigment Cell Res* v.9, p. 134–141, 1996.

SEUFFERLEIN, T.; ROZENGURT, E. Sphingosine induces p125FAK and paxillin tyrosine phosphorylation, actin stress fiber formation, and focal contact assembly in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* v.269, p. 27610–27617, 1994.

SEUFFERLEIN, T.; ROZENGURT, E. Sphingosylphosphorylcholine rapidly induces tyrosine phosphorylation of p125FAK and paxillin, rearrangement of the actin cytoskeleton and focal contact assembly. Requirement of p21rho in the signaling pathway. *J Biol Chem* v.270, p. 24343–24351, 1995.

SEVEAU, S.; BIERNE, H.; GIROUX, S.; PR

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* v.1,p. 31–39, 2000.

SINAI, A.P.; JOINER, K.A. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol* v.51, p.415-62, 1997.

SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B.M.; YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* v.59, no.4, p.526-9, 1998.

SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. Sialoglycoproteins and sialoglycolipids contribute to the negative surface charge of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* v.814, no.1, p.163-9, 1985.

SOUTO-PADRON, T.; CARVALHO, T.M.U.; CHIARI, E.; DE SOUZA, W. Further studies on the cell surface charge of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* v.3, p.215-25, 1984.

SOUTO-PADRON, T.; HARTH, G.; DE SOUZA, W. Immunocytochemical localization of neuraminidase in *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* v.58, no.3, p.586-92, 1990.

STAUFFER, T.P.; MEYER, T. Compartmentalized IgE receptor-mediated signal transduction in living cells. *J. Cell Biol* v.139, p.1447–54, 1997.

SUGII, S.; REID, P.C.; OHGAMI, N.; SHIMADA, Y.; MAUE, R.A.; NINOMIYA, H.; OHNO-IWASHITA, Y.; CHANG, T.Y. Biotinylated theta-toxin derivative as a probe to examine intracellular cholesterol-rich domains in normal and Niemann-Pick type C1 cells. *J Lipid Res.*, v.44, no.5, p.1033-41, 2003.

TACHADO, S.D.; GEROLD, P.; SCHWARZ, R.; NOVARKOVIC, S.; MCCONVILLE, M.; SCHOFIELD, L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci USA* v.94, p. 4022-4027, 1997.

TAKAHIRA, H.; GOTOH, A.; RITCHIE, A.; BROXMEYER, H.E. Steel factor enhances integrin-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (pp125FAK) and paxillin. *Blood* v.89, p. 1574–1584, 1997.

TAPIA, J.A.; CAMELLO, C.; JENSEN, R.T.; GARCIA, L.J. EGF stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin in rat pancreatic acini by a phospholipase C-independent process that depends on phosphatidylinositol 3-kinase, the small GTP-binding protein, p21rho, and the integrity of the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* no.1448, p. 486–499, 1999.

TARDIEUX, I.; NATHASON, M.H.; ANDREWS, N.W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med* v.179, p. 1017-1022, 1994.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* v.71, no.7, p.1117-30, 1992.

THYBERG, J. Caveolae and Cholesterol distribution in Vascular Smooth Muscle Cells of Different Phenotypes. *The Journal of Histochem. Cytochem.*, v.50, no.2, p.185-195, 2002.

TODESCHINI, A.R.; DIAS, W.B.; GIRARD, M.F.; WIERUSZESKI, J.; MENDONCA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J.O. Enzymatically inactive trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds sialyl and beta-galactopyranosyl residues in a sequential ordered mechanism. *J Biol Chem* v.279, no.7, p.5323-8, 2004.

TODOROV, A.G.; EINICKER-LAMAS, M.; DE CASTRO, S.L.; OLIVEIRA, M.M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem* v.275, no.41, p.32182-6, 2000.

- TORGERSEN, M.L.; SKRETTING, G.; VAN DEURS, B.; SANDVIG, K.
Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci.*, v.114, no.20, p.3737-47, 2001.
- TSUBOUCHI, A.; SAKAKURA, J.; YAGI, R.; MAZAKI, Y.; SCHAEFER, E.; YANO, H.; SABE, H. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/ 118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* v.159, p. 673–683, 2002.
- TURNER, C.E.; GLENNEY, JR. JR.; BURRIDGE, K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J Cell Biol* v.111, p. 1059–1068, 1990.
- TURNER, C.E.; PIETRAS, K.M.; TAYLOR, D.S.; MOLLOY, C.J. Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Sci* v.108, p. 333–342, 1995.
- TURNER, C.E. Paxillin is a major phosphotyrosine-containing protein during embryonic development. *J Cell Biol* v.115, p. 201–207, 1991.
- TURNER, C.E. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* no.2, p. E231–E236, 2000.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *J. Parasitol* v.31, p. 472-481, 2001.
- URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des* v.8, p. 287-295, 2002.
- VAN DER GOOT, F.G.; HARDER, T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol.*, v.13, no.2, p.89-97, 2001.
- VAN FURTH, R.; COHN, Z.A.; HIRSCH, J.G.; HUMPHREY, J.H.; SPECTOR, W.G; LANGEVOORT, H.L. The Mononuclear Phagocyte System: a new classification of

macrophages, monocytes and their precursors cell. *Bull. Wld. Hlth. Org* v.46, p. 845-852, 1972.

VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S.J.; PANAYOTOU, G.; WATERFIELD, M.D. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* v.7, p.267-72, 1997.

VASANJI, A.; GOSH, P.K.; GRAHAM, L.M.; EPPEL, S.J.; FOX, P.L. Polarization of plasma membrane microviscosity during endothelial cell migration. *Dev. Cell* v. 6,p. 29–41, 2004.

VENKATARAMAN, C.; KWAIK, Y. A. Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment to *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection*, v.2, p. 867–875, 2000.

VENKATARAMAN, C.; GAO, L.; BONDADA, S.; KWAIK, Y. A. Identification of Putative Cytoskeletal Protein Homologues in the Protozoan Host *Hartmannella vermiformis* as Substrates for Induced Tyrosine Phosphatase Activity upon Attachment to the Legionnaires' Disease Bacterium, *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* v.188, no.3, p. 505–514, 1998.

VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M.N. Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma cruzi*-host cell interaction: possible biological models--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 89, no.2, p. 298, 1994.

VIEIRA, M.; DUTRA, J.M.F.; CARVALHO, T.M.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol* v.118, p.6, p.491-500, 2002.

VIEIRA, M.C.; CARVALHO, T.M.U.; DE SOUZA, W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* v.203, no.2, p. 967-71,1994.

VILGRAIN, I.; CHINN, A.; GAILLARD, I.; CHAMBAZ, E.M.; FEIGE, J.J. Hormonal regulation of focal adhesions in bovine adrenocortical cells: induction of paxillin dephosphorylation by adrenocorticotrophic hormone. *Biochem J* v.332, p. 533–540, 1998.

VOLONTE, D.; GALBIATI, F.; LI, S.; NISHIYAMA, K.; OKAMOTO, T.; LISANTI, M.P. Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* v.274, p.12702–12709, 1999.

VRLJIC, M.; NISHIMURA, S.Y.; BRASSELET, S.; MOERNER, W.E.; MCCONNELL, H.M. Translational diffusion of individual class II MHC membrane proteins in cells. *Biophys. J* v.83, p.2681–92, 2002.

WADE, R.; VANDE POL, S. Minimal features of paxillin that are required for the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *Biochem J.*, v.393, no.2, p.565-73, 2006.

WANG, Z.; PAVALKO, F.M.; GUNST, S.J. Tyrosine phosphorylation of the dense plaque protein paxillin is regulated during smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* v.271, p. C1594–C1602, 1996.

WIEHART, U.I.; RAUTENBACH, M.; HOPPE, H.C. Selective lysis of erythrocytes infected with the trophozoite stage of *Plasmodium falciparum* by polyene macrolide antibiotics. *Biochem Pharmacol.*, v.71, no.6, p.779-90, 2006.

WILKOWSKY, S.E.; WAINSELBAUM, M.J.; ISOLA, E.L. *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca²⁺ during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. *Biochem Biophys Res Commun* v.222, no.2, p.386-9, 1996.

WILSON, B.S.; STEINBERG, S.L.; LIEDERMAN, K.; PFEIFFER, J.R.; SURVILADZE, Z.; ZHANG, J.; SAMELSON, L.E.; YANG, L.H.; KOTULA, P.G.;

OLIVER, J.M. Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol. Biol. Cell* v.15, p.2580–92, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease. Buenos Aires, Argentina 17-20 April 2005.

WOOLSEY, A.M.; BURLEIGH, B.A. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol* v.9, p.829-38, 2004.

WYLIE, S.R.; CHANTLER, P.D. Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth. *Nat Cell Biol* v.3, p. 88–92, 2001.

YAKUBU, M.A.; MAJUMDER, S.; KIERSZENBAUM, F. Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affect calcium ion levels. *Mol Biochem Parasitol* v.66, no.1, p.119-25, 1994.

YAMASAKI, M.; ARAI, H.; ASHIDA, N.; ISHII, K.; KITA, T. Monocyte chemoattractant protein 1 causes differential signalling mediated by proline-rich tyrosine kinase 2 in THP-1 cells. *Biochem J* v.355, p. 751–756, 2001.

YEUNG, Y.G.; WANG, Y.; EINSTEIN, D.B.; LEE, P.S.; STANLEY, E.R. Colony-stimulating factor-1 stimulates the formation of multimeric cytosolic complexes of signaling proteins and cytoskeletal components in macrophages. *J Biol Chem* v.273, p. 17128–17137, 1998.

YOUNG, M.R.; LIU, S.W.; MEISINGER, J. Protein phosphatase-2A restricts migration of Lewis lung carcinoma cells by modulating the phosphorylation of focal adhesion proteins. *Int J Cancer* v.103, p. 38–44, 2003.

YU, H.G.; SCHRADER, H.; OTTE, J.M.; SCHMIDT, W.E.; SCHMITZ, F. Rapid tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130Cas by gastrin in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* v.67, p. 135–146, 2004.

ZAAS, D.W.; DUNCAN, M.; RAE WRIGHT, J.; ABRAHAM, S.N. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochim Biophys Acta* v.1746, no.3, p. 305-13, 2005.

ZACHARY, I.; SINNETT-SMITH, J.; TURNER, C.E.; ROZENGURT, E. Bombesin, vasopressin, and endothelin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* v.268, p. 22060–22065, 1993.

ZELEDON, R.; ALVARENGA, N.J.; SCHOSINSKY, K. In “Chagas’s Disease,” pp.59. *Pan American Health Organization*. Publ. No. 347, 1997.

ZHANG, J.; ZHANG, L.X.; MELTZER, P.S.; BARRETT, J.C.; TRENT, J.M. Molecular cloning of human Hic-5, a potential regulator involved in signal transduction and cellular senescence. *Mol Carcinog* v.27, p. 177– 183, 2000.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K.P. Activation of tyrosine kinases by alpha1A-adrenergic and growth factor receptors in transfected PC12 cells. *Biochem J* v.344, p. 889–894, 1999.

ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v.94, no. 1, p.159-64, 1999.

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](#)