

DANIELA CAMPOS LOURENÇO

METACICLOGÊNESE DE *Trypanosoma cruzi*:
INFLUÊNCIA DO ACÚMULO DE TRAÇADORES
ENDOCÍTICOS NOS RESERVOSSOMOS E
MODULAÇÃO DA CRUZIPAÍNA

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Biofísica

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



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

2008

Daniela Campos Lourenço

Metaciclologênese de *Trypanosoma cruzi*: influência do acúmulo de traçadores endocíticos nos reservossomos e modulação da cruzipaína

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador:
Narcisa Leal da Cunha e Silva

Rio de Janeiro
2008.

LOURENÇO, Daniela Campos

Metacicloênese do *Trypanosoma cruzi*: influência do acúmulo de traçadores endocíticos nos reservossomos e modulação da cruzipaína.

Dissertação de tese: Mestre em Ciências Biológicas – Biofísica

- | | |
|-----------------------------|---------------|
| 1- <i>Trypanosoma cruzi</i> | 4- Cruzipaína |
| 2- Metacicloênese | 5- Chagasina |
| 3- Reservossomos | |

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ultra-estrutura Celular Hertha Meyer, pertencente ao Programa de Biologia Celular e Parasitologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Dra. Narcisa Leal da Cunha e Silva, com auxílios financeiros cedidos por:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES)
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Programa Núcleos de Excelência (PRONEX 661030-1996/2)

"Se ao escalar uma montanha na direção de uma estrela, o viajante se deixa absorver demasiado pelos problemas da escalada, arrisca-se a esquecer qual é a estrela que o guia."
Antoine de Saint-Exupéry

Dedico esta tese aos meus pais Albino e Terezinha, meus irmãos Fábio e Natália por todo carinho e apoio. Ao Bruno pelo amor, companheirismo e por fazer minha vida mais colorida e completa.

Agradecimentos:

- ♥ A Deus pela proteção, por sempre iluminar meus caminhos e por me dar a cada dia a oportunidade de recomeçar.
- ♥ Aos meus pais Albino e Terezinha por todo amor, apoio e por sempre me possibilitar oportunidades para realizar meus sonhos. A Natália pelo companheirismo, carinho e diversão. Espero poder ser um exemplo pra você por que você é para mim! Ao Fábio e Fátima pelo carinho e preocupação que sempre tiveram comigo. A Bibi por ser a coisa mais fofa desse mundo e por sempre me trazer felicidade com seu sorriso. Amo vocês!
- ♥ Ao Bruno por ser essa pessoa maravilhosa. Obrigada por fazer parte da minha vida e por aguentar meus “maus” momentos. Todas as minhas conquistas são suas conquistas. Ter você ao meu lado é o maior bem que eu poderia possuir. Com certeza tudo seria muito mais difícil sem você! Você fez muita falta nesses 5 anos... Te amo!
- ♥ A Narcisa pela oportunidade de realizar este trabalho, por todo apoio, carinho e muitos conselhos. Obrigada pela ajuda e por sempre resolver meus problemas!
- ♥ Ao Celso por toda ajuda, carinho e pela diversão constante. Obrigada pela confiança que você sempre teve em mim, ela é mútua, e obrigada por torcer sempre por mim! Você vai longe menino...só não esqueça do meu nome!
- ♥ A Mari Hammes pela infinita ajuda e pela graça de menina que você é, sempre trazendo calma, alegria e sabedoria. Obrigada principalmente pela amizade e pelo carinho que você tem por mim. Você é um exemplo! Me sinto um pessoa de muita

sorte por ter você como amiga! Minha admiração, gratidão e amizade por você serão eternas! Te adoro menina!

- ♥ A Ju Vidal por toda sua ajuda, pela confiança que você tem em mim e pelas infinitas conversas. Obrigada pela sua amizade, ela é muito importante pra mim e espero que dure pra sempre. Nunca deixe que os problemas atrapalhem seus objetivos, você é muito maior que eles! Conte comigo...sempre! Adoro você!
- ♥ A Leticia e Emile pela companhia, pelas angústias compartilhadas pelas conversas e pelos risos infinitos. Compartilhar problemas os torna menores...e isso com certeza aconteceu com a gente! Sem vocês não seria possível! Lê, obrigada pelo carinho e por sempre me escutar. Você vai ser um sucesso em qualquer coisa que resolva fazer porque seu talento é enorme! Só não esqueça dessa sua amiga que te adora muito! Emile, só te desejo sorte e tranquilidade na sua jornada que recomeça porque talento você tem de sobra. Só não abandone seu sorriso e sua graça...são contagiantes! Adoro você!
- ♥ A Sarah por toda ajuda, pela amizade e pelo carinho que apesar da distância, sei que você ainda tem por mim! Nunca vou esquecer das nossas conversas e da nossa pizza! Sinto sua falta menina! Adoro você!
- ♥ A Loraine pela amizade, conselhos e pela diversão! Você vai fazer muita falta!
- ♥ A Bel pela ajuda, conselhos e pelo carinho que sempre teve por mim! Sua amizade significa muito pra mim!
- ♥ Aos professores Márcia, Rossiane, Técia, Cristina, Thaïs, Kildare e Wanderley por todo apoio e dedicação. Rô, obrigada pelo seu carinho e sua amizade! Thaïs obrigada por toda ajuda, apoio e pela correção da minha dissertação! Cris, obrigada

por sempre acreditar em mim e pelas ótimas conversas. Kildare, obrigada por sempre ter algo pra me ensinar e pelo carinho! Sua amizade é muito importante pra mim!

- ♥ Ao Bosco e Nete pela ajuda incansável de vocês e por tornarem sempre o laboratório um ambiente muito mais divertido.
- ♥ Ao Leandro e Joana pelo carinho, por todo apoio e por todas as implicâncias! Vocês são uns amores e fazem muita falta no lab!
- ♥ A Juliany, pela amizade, pelo apoio que sempre me deu e pelas infinitas conversas! Meu carinho por você é pra sempre! Te adoro!
- ♥ Aos companheiros do lab: Miria, Gustavo, Dani Cavalcanti, Alan, Iamara, Paulo, Thiago Manchester, Thiago Luiz, Júlio, Érica, Cláudia Maia, Lia, Wendel, por todo apoio, pela ajuda que sempre me deram e pela convivência. Vocês vão longe!
- ♥ Ao grupinho mais simpático: Gisele, Karlinha, Tati e Mari Garcia, obrigada pela amizade, carinho, por toda ajuda, por deixarem o lab muito mais divertido e ainda se preocuparem com ele. Vocês são umas graças e vão longe por que o talento de vocês é do tamanho dos seus corações!
- ♥ Ao meu “irmão” Thiago Guima por estar sempre do meu lado mesmo estando longe, pelo carinho e pelos abraços apertados! Sinto sua falta e das nossas conversas! Te adoro!
- ♥ As minhas “irmãs” queridas Aline, Bruna, Cris e Ju, por sempre acreditarem em mim e por me darem força sempre que precisei! Obrigada pela amizade, pelas conversas, pelas broncas e pelos abraços! Vocês fazem a diferença na minha vida! Amo vocês!

Abreviaturas

- BSA – Albumina bovina
- CP – Cisteína protease
- CZP – Cruzipaína
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DTT – Ditioneitol
- E-64 – 1[[[L-Trans-epoxisuccinil]-leucil]amino]4-guanidino butano
- EDTA – Ácido etileno diamino tetraacético
- LAMP – Glicoproteína de membrana associada ao lisossoma
- LIT – Infusão de fígado e triptose
- LRO – Organelas Relacionadas a Lisossomos
- PBS – Salina tamponada por fosfato
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio
- SFB – Soro fetal bovino
- TAU – Urina artificial de Triatomíneo
- Tf – Transferrina
- Tris – 2-amino-2hidroximetilpropano-1,3-diol
- Z-Phe-Arg-MCA–Benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-argynil-7-amino-4methyl-coumarin

Resumo

Trypanosoma cruzi possui um complexo ciclo de vida, alternando entre um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado. Formas epimastigotas proliferam no intestino do inseto e por um processo denominado metaciclologênese originam as formas infectivas, porém não replicativas, os tripomastigotas metacíclicos. O processo de metaciclologênese, que pode ser reproduzido *in vitro*, envolve mudanças morfológicas, funcionais e nos níveis de expressão de proteínas. Os epimastigotas de *T. cruzi* endocitam macromoléculas do meio extracelular e as acumulam em organelas determinadas reservossomos. Nesta mesma organela também se concentram a cisteína-protease de maior atividade destes parasitas, a cruzipaína, e seu inibidor natural, a chagasina. A cruzipaína possui um papel importante na infecção da célula hospedeira, na sobrevivência do *T. cruzi* na célula infectada e no processo de diferenciação deste parasita. A cruzipaína apresenta altos níveis de expressão nos epimastigotas e amastigotas e níveis baixos nas formas tripomastigotas. Neste estudo analisamos os efeitos da acumulação de traçadores endocíticos nos reservossomos no processo de metaciclologênese. Demonstramos que o acúmulo de material endocitado não impede a diferenciação e que esses traçadores permanecem acumulados nos reservossomos de formas intermediárias. Uma pequena porcentagem da população de tripomastigotas também mantém os traçadores acumulados em organelas que podem estar relacionadas com os reservossomos de formas epimastigotas. Análises por western blot e por ensaios enzimáticos durante o processo de metaciclologênese mostraram uma diminuição da expressão e da atividade de cruzipaína acompanhados por um aumento de chagasina, indicando uma relação inversa entre eles. Análises por imunofluorescência de formas intermediárias mostraram uma co-localização da enzima e de seu inibidor nos

reservossomos e na região anterior, mas também regiões onde apenas um deles foi encontrado. Mudanças na expressão e atividade da cruzipaína e chagasina durante a metaciclôgênese podem ser muito importantes para todo o processo.

Abstract

Trypanosoma cruzi has a complex life cycle alternating between an insect vector and a mammalian host. Epimastigotes proliferate inside the insect vector gut and by metacyclogenesis process originate infective and non-replicative forms, the trypomastigotes. Metacyclogenesis involves morphological, functional and protein expression changes, and can be reproduced *in vitro*. *T. cruzi* epimastigote forms store macromolecules obtained from medium by endocytosis in the reservosomes. In this same compartment the parasite concentrate their major protease, cruzipain and its natural inhibitor chagasin. Cruzipain plays an important role in parasite infectivity, intracellular growth and differentiation and shows high level in the epimastigote and amastigote forms and low level in trypomastigotes. In this study we analyze the effects of the accumulation of endocytic tracers in reservosomes on metacyclogenesis. We demonstrated that the accumulation of endocytic tracers in reservosomes do not impair the process of metacyclogenesis. Besides, these tracers remained stored in reservosomes of intermediate forms. A small percentage of trypomastigote population showed the accumulation of the tracers in organelles that were related to the reservosomes of epimastigotes. Western blot and enzymatic assays during metacyclogenesis process showed a decrease in the expression and activity of cruzipain accompanied by an increase of chagasin, indicating an inverse correlation between them. Immunofluorescence of intermediate forms showed colocalization of the enzyme and its inhibitor in reservosomes and anterior region, but also compartments where only one of them was found. Changes in expression and activity of cruzipain and chagasin during metacyclogenesis may be very important for the whole process.

Índice

1 – Introdução	1
1.1 - <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	1
1.2 - Formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	4
1.3 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.4 - Metaciclogênese <i>in vitro</i>	9
1.5 - Via endocítica em <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.5.1 – Citóstoma	11
1.5.2 – Reservossomos	15
1.6 - Cruzipaina - A cisteíno-protease majoritária do <i>T. cruzi</i>	19
1.7- Chagasina – O inibidor natural da cruzipaina	21
2- Racional	23
3 – Objetivos	25
4- Materiais e Métodos	26
4.1- Parasitas	26
4.2- Metaciclogênese <i>in vitro</i>	26
4.3- Contagem diferencial	27
4.4- Ensaios de Endocitose associados à metaciclogênese	27
4.5- Anticorpos	28
4.6- Microscopia ótica – Imunofluorescência.....	28
4.7- Microscopia eletrônica de transmissão	29
4.8- Obtenção do extrato protéico dos parasitas	29
4.9- Análise por Western blot	30

4.10- Dosagem enzimática da cruzipaina e da atividade inibitória da chagasina durante o processo de metaciclo gênese.....	31
5- Resultados	33
5.1- Metaciclo gênese “ <i>in vitro</i> ”	33
5.2- Ultra-estrutura de parasitas no processo de metaciclo gênese “ <i>in vitro</i> ”.....	36
5.3- Destino dos traçadores endocíticos nos estágios de desenvolvimento obtidos durante a metaciclo gênese “ <i>in vitro</i> ”	43
5.4- Expressão de cruzipaina e seu inibidor durante o processo de metaciclo gênese.....	60
5.5- Imunofluorescência	67
5.6- Dosagem enzimática da cruzipaina e da atividade inibitória da chagasina durante o processo de metaciclo gênese.....	70
6- Discussão	73
6.1- Metaciclo gênese <i>in vitro</i>	73
6.2- Ultraestrutura de parasitas no processo de metaciclo gênese.....	73
6.3- Destino dos traçadores endocíticos nos estágios de desenvolvimento obtidos durante a metaciclo gênese “ <i>in vitro</i> ”	75
6.4- Expressão, atividade e localização da cruzipaina e seu inibidor durante o processo de metaciclo gênese	79
7- Conclusões	84
8- Referências	85

1 - Introdução

1.1 - *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

Trypanosoma cruzi é o agente causador da doença de Chagas em humanos, que se encontra prevalente em muitos países. Estimativas da Organização Mundial de Saúde indicam que existem cerca de 20 milhões de pessoas na América Latina infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, sendo mais de 16 milhões encontradas em áreas endêmicas da América do Sul e da América Central. Cerca de 25% da população total das áreas acima citadas encontram-se em risco de contrair a infecção (WHO, 2006).

A doença de Chagas se caracteriza por uma fase aguda que dura entre 4 a 8 semanas, podendo-se observar sintomas como febre, edema da face e das extremidades inferiores e linfadenopatia generalizada. Nesta fase, pacientes infectados apresentam uma intensa parasitemia, onde se observam diversos tecidos parasitados, incluindo o coração e até mesmo o sistema nervoso central. Porém, na maioria dos casos a doença não é diagnosticada nesta fase, devido à ausência de sintomas específicos (WHO, 2006). Os pacientes que se encontram na fase crônica indeterminada da doença, apresentam anticorpos circulantes contra vários antígenos do *T. cruzi* e uma diminuição da parasitemia em função da atividade do sistema imune do hospedeiro, porém não apresentam sintomas. O período de duração da fase indeterminada pode variar entre meses, anos ou décadas. Os sinais clínicos da fase crônica sintomática são perturbações cardíacas (miocardite crônica), digestivas (síndrome de mega esôfago, cólon e intestino) e neurológicas (dados WHO, 2006). Existem poucos medicamentos eficazes somente na fase aguda da doença. No entanto, esses medicamentos possuem efeitos tóxicos e causam diversos efeitos colaterais

nos pacientes. Ainda não há tratamento para doentes na fase crônica, o que torna o estudo desse parasito de extrema importância no campo médico, parasitológico e da biologia celular.

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae (Chagas, 1909). Podemos considerar que a superfície celular dos tripanosomatídeos é formada por dois componentes: a membrana plasmática com seu glicocálice e uma camada de citoesqueleto subjacente formada pelos microtúbulos sub-peliculares. Na maioria das células eucarióticas é bem estabelecido que microtúbulos e microfilamentos possuem uma associação à membrana plasmática, no entanto, em nenhum outro tipo celular tal associação é tão forte quanto nos tripanosomatídeos. Nesses protozoários os dois componentes da superfície permanecem associados mesmo após a lise da célula e isolamento de uma fração enriquecida em membrana (revisto por De Souza, 2002). O *T. cruzi*, assim como outros membros da família Trypanosomatidae, possui apenas uma mitocôndria que se estende por todo o corpo celular. Numa certa porção da mitocôndria, localizada próximo ao corpúsculo basal, se concentra o DNA mitocondrial, formando uma estrutura conhecida como cinetoplasto, que é identificadora da ordem. A morfologia do cinetoplasto difere entre as formas evolutivas do *T. cruzi*. O flagelo de *T. cruzi* tem estrutura e composição peculiares, que o tornam muito importante para alguns aspectos da biologia do protozoário. Além do movimento celular, um papel importante realizado pelo flagelo seria a adesão ao epitélio do trato digestivo do inseto, o que é um passo essencial na diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Zeledón *et al.*, 1984). Quando a metaciclo-gênese é reproduzida *in vitro*, epimastigotas do clone Dm28c secretam um glicoconjugado de baixa densidade que flutua sobre o meio de cultura e ao qual os parasitos se aderem pela extremidade do flagelo para então iniciar o

processo de diferenciação (Contreras et al., 1988). Outro papel importante realizado pelo flagelo foi verificado na diferenciação de tripomastigotas para amastigotas, que ocorre livre no citoplasma das células do hospedeiro vertebrado quando há uma maciça degradação dos componentes flagelares que serão apresentados ao sistema imune de modo diferencial (Gonzalez Cappa *et al.*, 1980).

Todos os tripanosomatídeos apresentam uma região conhecida como bolsa flagelar, uma depressão encontrada na região anterior da célula, de onde emerge o flagelo. Ela é formada por uma invaginação da membrana plasmática que estabelece continuidade direta com a membrana do flagelo (Webster & Russell, 1993). A bolsa flagelar também pode ser considerada um compartimento extracelular especial, de certo modo isolado do meio extracelular, pois no ponto de emergência do flagelo, a membrana do corpo celular e a membrana do flagelo apresentam uma adesão. Além disso, a bolsa flagelar é uma região altamente especializada da superfície de tripanosomatídeos, pois é a única região que não apresenta a camada de microtúbulos sub-peliculares. A membrana que contorna a bolsa apesar de ser contínua à membrana do corpo celular e a do flagelo apresenta características diferentes em termos da distribuição de partículas intramembranas e localização de proteínas, incluindo algumas enzimas (revisto em De Souza 1989), e também é o lugar onde ocorre intensa atividade endocítica e exocítica (Landfear & Ignatushchenko, 2001). Outra importante invaginação da membrana plasmática é o complexo citóstoma-citofaringe, o sítio majoritário de captação de nutrientes do meio externo pelo *T. cruzi* (Milder & Deane, 1969; Porto-Carreiro *et al.*, 2000).

O *T. cruzi* também apresenta estruturas citoplasmáticas, como os glicosomos que armazenam quase todas as enzimas da via glicolítica (Michels et al., 2005) além de ser também o local onde algumas vias metabólicas acontecem, como por exemplo, fixação de

dióxido de carbono (Oppendoes & Cottem, 1982), entre outras; os reservossomos, que são organelas onde proteínas e lipídios ingeridos são armazenados (Soares *et al.*, 1988), serão descritos detalhadamente mais adiante, e os acidocalcissomas, organelas que acumulam íons cálcio e fósforo, apresentam em sua membrana uma H⁺-ATPase vacuolar que pode exercer um papel na regulação do pH citoplasmático e uma Ca²⁺-ATPase (Scott *et al.*, 1997; Vercesi *et al.*, 1994).

1.2 - Formas evolutivas do *T. cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário heteroxênico, pois alterna seu ciclo evolutivo entre dois hospedeiros, um invertebrado e outro vertebrado, apresentando três formas evolutivas que podem ser identificadas por microscopia óptica, onde se observa o aspecto geral do parasita, seu núcleo, cinetoplasto e flagelo. A distinção entre os estágios de desenvolvimento é feita através da observação da forma geral da célula, da região da célula de onde o flagelo emerge da bolsa flagelar e da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Através da análise dessas características podemos distinguir as seguintes formas evolutivas: a) os epimastigotas, que são as formas replicativas encontradas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado, apresentam o corpo alongado (20-40µm) com o núcleo na porção central, cinetoplasto em formato de bastão localizado na região anterolateral da célula e o flagelo que emerge na mesma região; ii) os tripomastigotas, que são as formas infectivas, porém não replicativas, são encontradas nos dois hospedeiros. Eles apresentam o corpo mais delgado do que o das formas epimastigotas (aproximadamente 25 µm de comprimento e 2 µm de diâmetro), cinetoplasto arredondado localizado na região posterior da célula e o flagelo que emerge da região postero-lateral do corpo celular ; iii) os amastigotas, que são as formas intracelulares no hospedeiro vertebrado, também capazes de se dividir, apresentam o corpo arredondado, cinetoplasto em forma de bastão que se

localiza na região anterior da célula e apresentam um pequeno flagelo que emerge da porção anterior do parasita. (revisto por De Souza, 1999) (Figura 1).

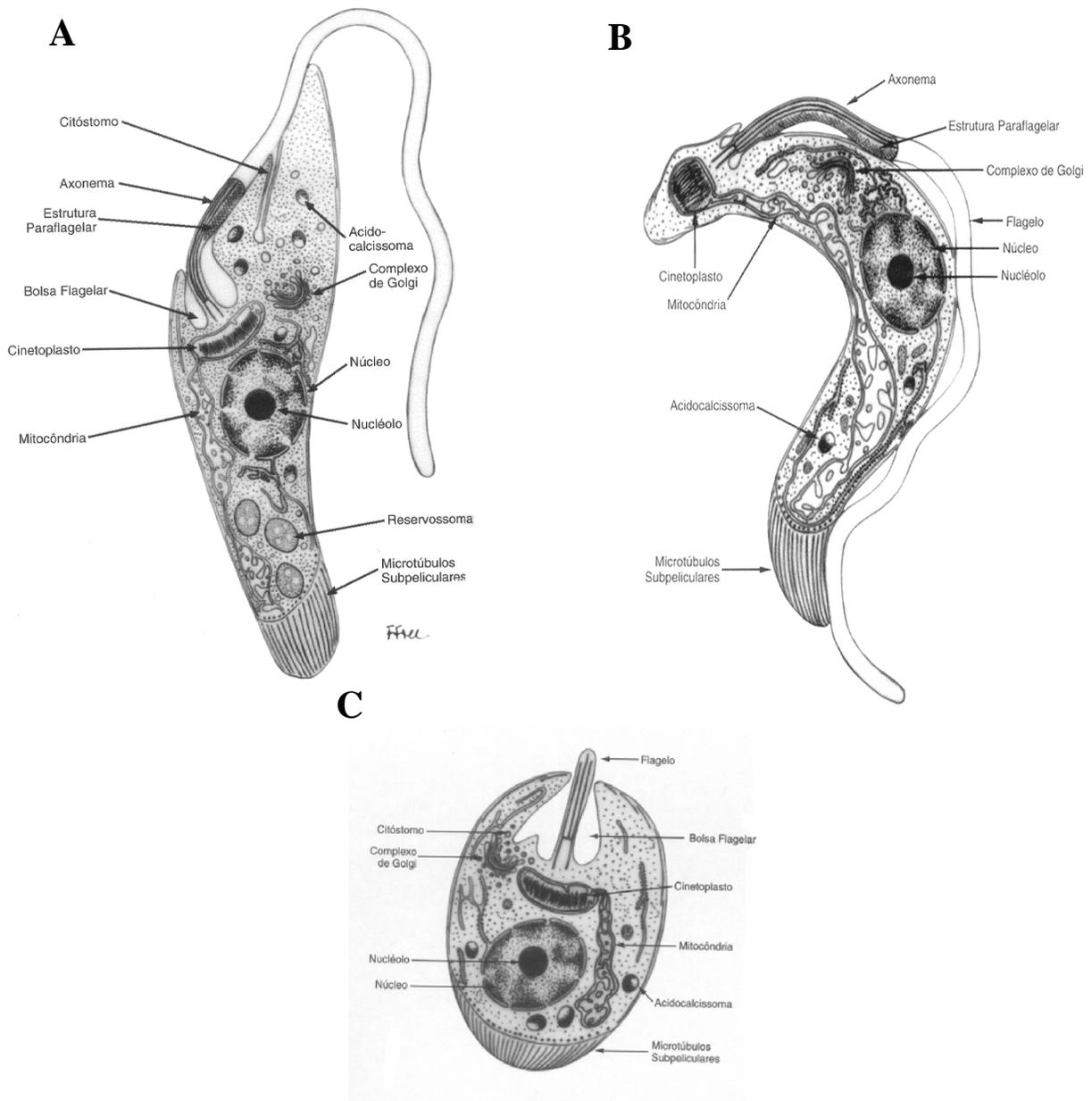


Figura 1: Esquema dos aspectos morfológicos gerais das formas epimastigotas (A), tripomastigotas (B), e amastigotas (C) do *Trypanosoma cruzi* (De Souza, 1999).

1.3 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

No ciclo evolutivo do *T.cruzi* o hospedeiro invertebrado adquire o parasito na forma tripomastigota durante o repasto sangüíneo em hospedeiros vertebrados infectados. Ao chegar ao estômago do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas que posteriormente migram para o intestino onde se aderem através do flagelo às células do epitélio intestinal, evento esse extremamente necessário à diferenciação celular. Em seguida, ocorre a multiplicação das formas epimastigotas por fissão binária. Na porção final do intestino, ocorre um fenômeno conhecido como metaciclogênese, onde as formas epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas metacíclicos, liberados junto com as fezes do triatomíneo, podem penetrar no hospedeiro vertebrado através de pequenas feridas na pele ou pela mucosa. As formas epimastigotas que tem acesso ao organismo do hospedeiro vertebrado, são rapidamente eliminadas por células de defesa e pelo sistema complemento do hospedeiro. As formas tripomastigotas metacíclicas são capazes de infectar qualquer célula do hospedeiro vertebrado, existindo, porém um tropismo dependente da cepa infectante (Brenner, 1985). Os tripomastigotas infectam as células do hospedeiro vertebrado através de um reconhecimento de componentes localizados na superfície do parasito e da célula hospedeira. Foi sugerido que essa adesão seja mediada por glicoproteínas e lectinas tanto do parasito quanto das células hospedeiras. Desta maneira, componentes localizados na superfície do parasito e da célula hospedeira desempenham papéis importantes para a invasão (Burleigh e Woolsey, 2002). O parasita então é interiorizado via uma depressão de membrana (Burleigh e Andrews, 1998), que desencadeia uma cascata de sinalização disparando um pico de cálcio tanto no parasita quanto na célula hospedeira (Dorta *et al.*, 1995) e promovendo a ativação de kinases e fosfatases no sítio de contato célula-célula

(Vieira *et al.*, 2002). Após a invasão, os tripomastigotas encontram-se transientemente no vacúolo parasitóforo, cuja membrana é gradualmente degradada (Carvalho *et al.*, 1989) devido à liberação de enzimas pelo parasito (Andrews *et al.*, 1990) e ação da proteína do tipo porina denominada Tc-tox (Andrews *et al.*, 1990). Neste mesmo momento, os lisossomos se fundem com o vacúolo e liberam seu conteúdo, tornando-o ácido (Andrews, 1993). Através desses processos as formas tripomastigotas escapam para o citoplasma celular, onde ocorre a diferenciação para formas amastigotas. Os amastigotas iniciam um processo de divisões sucessivas e posteriormente se re-diferenciam em tripomastigotas, ocorrendo em seguida o rompimento das células hospedeiras. Os tripomastigotas são liberados no meio extracelular podendo alcançar a corrente sanguínea através do qual alcançam outras regiões do corpo do hospedeiro vertebrado infectando novas células ou, enquanto na circulação, serem capturados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo (De Souza, 1999) (Figura 2).



Fonte –World Health Organization (WHO) - <http://www.who.int/tdr>. Adaptado por Daniela Lourenço

Figura 2 - Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*: O ciclo do *T. cruzi* se alterna entre dois hospedeiros. No hospedeiro invertebrado encontramos as formas epimastigotas que após sucessivas divisões se diferenciam para formas tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas metacíclicos são liberados juntamente com as fezes do hospedeiro invertebrado e podem penetrar no hospedeiro vertebrado através de pequenas feridas na pele ou pela mucosa. No hospedeiro vertebrado os tripomastigotas podem infectar diversas células, se diferenciando posteriormente em formas amastigotas. Os amastigotas iniciam um processo de divisões sucessivas e se re-diferenciam em tripomastigotas, ocorrendo em seguida o rompimento das células hospedeiras. Os tripomastigotas são liberados no meio extracelular podendo alcançar a corrente sanguínea através do qual alcançam outras regiões do corpo do hospedeiro vertebrado infectando novas células ou, enquanto na circulação, serem capturados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo.

1.4 - Metaciclo^gênese *in vitro*

As etapas do ciclo de vida do *T. cruzi* podem ser reproduzidas *in vitro*, o que possibilitou o entendimento de diversos fatores relacionados ao processo de diferenciação. Um processo bem conhecido é a metaciclo^gênese, que consiste na diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota, passo crucial no ciclo de vida desse parasito. Este processo de diferenciação envolve mudanças morfológicas, funcionais e nos níveis de expressão de diversas proteínas. Sabe-se que o processo de metaciclo^gênese é disparado por diversos fatores, como: variação de pH e a falta de alguns nutrientes ou exaustão dos mesmos (Camargo, 1964; Figueiredo et al, 1994). Estudos anteriores estabeleceram, baseados na variação de pH, dois grupos de cultura, onde em um tipo de variação se permitia a multiplicação dos parasitas e em outro a diferenciação (Fernandes *et al.*, 1969). Outra maneira de disparar o processo de diferenciação *in vitro* foi a utilização de meios pobres de composição química não definida. Porém, para obter um melhor entendimento dos fatores relacionados a metaciclo^gênese, foi necessária a utilização de meios quimicamente definidos. Com isso então, o desenvolvimento do meio TAU (Triatomine Artificial Urine) em combinação com o meio TAUP (meio TAU suplementado com prolina, aminoácido majoritário da urina do vetor) forneceu um excelente protocolo para diferenciação (Contreras *et al.*, 1985). Porém, atualmente, o melhor sistema de diferenciação *in vitro* utiliza o clone Dm28c mantido em meio LIT como epimastigota. Posteriormente, esses parasitas são transferidos para o meio TAU, onde permanecem por algumas horas e finalmente são transferidos para o meio TAU3AAG, um meio definido de composição pobre, suplementado com aminoácidos (Contreras *et al.*, 1988). Estes autores demonstraram que os tripomastigotas metacíclicos obtidos através do processo de

metacicloênese em meio definido apresentavam as mesmas características biológicas observadas nos tripomastigotas obtidos *in vivo*.

Existem algumas características importantes do processo de diferenciação *in vitro* que devem ser citadas: o processo não apresenta o mesmo rendimento para diferentes cepas; os parasitos obtidos podem apresentar mudanças fisiológicas, como virulência e resistência à lise por complemento quando comparados às mesmas formas obtidas “*in vivo*”. Tais características são observadas nas formas intermediárias formadas ao longo do processo de diferenciação (Contreras *et al.*,1985). As formas intermediárias possuem um papel fundamental neste estudo, pois mostram a progressão do processo de diferenciação, visto que, encontramos formas intermediárias em todas as etapas da metacicloênese.

1.5 - Via endocítica em *Trypanosoma cruzi*

Um aspecto fundamental para o entendimento da biologia celular do *T. cruzi* é o estudo da captação de nutrientes por estas células, pois tal processo constitui um dos principais desafios encontrados por este parasita durante seu complexo ciclo biológico, além de ser necessário para sua diferenciação e desenvolvimento. O processo de captação de nutrientes, a via, o tráfego endocítico, os compartimentos envolvidos, assim como, as proteínas residentes nestes compartimentos e seus marcadores moleculares ainda não são completamente conhecidos. O processo endocítico foi apenas observado nas formas epimastigotas, sendo ausente nas formas tripomastigotas e amastigotas (De Souza, 2002). A forma epimastigota apresenta intensa capacidade endocítica e é capaz de ingerir macromoléculas presentes no meio extracelular por endocitose de fase fluída (De Souza *et al.*, 1978), assim como por endocitose mediada por receptores (Soares e De Souza, 1991). O processo endocítico nas formas epimastigotas é altamente polarizado, ou seja, a ingestão

de material acontece em duas regiões especializadas presentes na superfície do parasita: a bolsa flagelar e o complexo citóstoma-citofaringe (Soares & De Souza., 1991).

1.5.1 - Citóstoma

O complexo citóstoma-citofaringe é uma estrutura encontrada somente nos parasitas do grupo Estercoraria, isto é, os que são liberados junto às fezes do inseto vetor como o *T. cruzi* e o *T. conorhini* (Milder & Deane, 1969). Dentre as formas evolutivas do *T. cruzi* o citóstoma é encontrado nas formas epimastigotas e amastigotas, embora esta última forma evolutiva não apresente nenhuma atividade endocítica detectada até o presente momento. Um estudo detalhado por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que o complexo citóstoma-citofaringe possui morfologia em formato de funil sendo constituído por uma abertura presente na superfície do parasita (o citóstoma) e uma invaginação de membrana que se aprofunda em direção ao interior do corpo celular podendo alcançar a região perinuclear (citofaringe). A invaginação da membrana é sempre acompanhada por um conjunto de microtúbulos e vesículas, de função ainda não determinada (Milder & Deane, 1969). Análises por criofratura da região do citóstoma mostraram que esta região de membrana plasmática não apresenta partículas intramembranas, mas sua superfície real é rica em glicoconjugados e delimitada por duas fileiras de proteínas integrais transmembrana formando uma imagem semelhante às fileiras de partículas observadas nas junções do tipo oclusivas (Martinez-Palomo *et al.*, 1976). Utilizando as técnicas de contrastação negativa (Okuda *et al.*, 1999) e de rotina em microscopia eletrônica de transmissão (Porto-Carreiro *et al.*, 2000) foi demonstrado que a região do citóstoma é contínua com a membrana da bolsa flagelar. Alguns grupos vêm pesquisando sobre o real diâmetro da abertura do citóstoma. Martinez-Palomo e colaboradores (1976), determinaram

que o citóstoma apresenta o diâmetro de 300nm através da fixação das células por congelamento rápido e posterior fratura das mesmas no aparelho de criofratura. No entanto, VataruNakamura e colaboradores (2004) utilizando a microscopia de varredura de alta resolução, mostraram que o citóstoma possui 150nm de diâmetro. Provavelmente a diferença no diâmetro da abertura do citóstoma encontrada pelos dois autores está relacionada ao tipo de metodologia aplicada para a determinação desta medida. Por outro lado também é possível que os parasitas analisados pelos dois grupos se encontravam em diferentes condições fisiológicas que levaram à variação do diâmetro de abertura do citóstoma no momento da análise. Nosso grupo vem pesquisando também o diâmetro máximo que uma partícula pode ter para ser ingerida via o complexo citóstoma-citofaringe. Neste trabalho formas epimastigotas são capazes de ingerir somente microesferas fluorescentes de 100 e 200nm, onde as microesferas de 200nm apresentaram um atraso na cinética de captação. Tamanhos maiores de microesferas ficaram retidas nos sítios de entrada (manuscrito em preparação). O citóstoma-citofaringe está exclusivamente relacionado ao processo de captação de nutrientes presentes no meio externo sendo este complexo o sítio majoritário de ingestão de nutrientes (Porto Carreiro *et al.*, 2000), não sendo encontrada até o momento nenhuma atividade exocítica.

No *T. cruzi* o material endocitado é internalizado via bolsa flagelar e citóstoma (Soares & De Souza, 1991; Porto Carreiro *et al.*, 2000). A partir da bolsa flagelar e do fundo da citofaringe brotam vesículas lisas, isto é, que não apresentam revestimento na porção citoplasmática. Essas vesículas entregam o material endocitado para o primeiro compartimento da via endocítica, um sistema túbulo-vesicular que se estende da região perinuclear até a porção posterior do parasita (Porto Carreiro *et al.*, 2000). Devido ao fato de possuir caráter ácido, como demonstrado por experimento com laranja de acridina, e por

ser o primeiro compartimento da via endocítica, foi caracterizado como endossoma inicial, embora ainda não seja conhecido um marcador molecular para esta organela. Outros autores sugerem que este compartimento não possa ser caracterizado como endossoma inicial, pois através do bloqueio da endocitose com baixas temperaturas não se detectou o acúmulo de traçadores endocíticos em compartimentos intracelulares do *T. cruzi*, ao contrário do que é observado em células de mamíferos e no *T. brucei* (Figueiredo & Soares, 2000). Dos compartimentos endossomais iniciais brotam vesículas que se fundem aos reservossomos (Porto Carreio *et al.*, 2000), as organelas finais da via endocítica (Soares e De Souza, 1998) (Figura 3). Mais recentemente foi descrito a presença de vesículas revestidas por clatrina provenientes da endocitose na região da bolsa flagelar (Corrêa *et al.*, 2007).

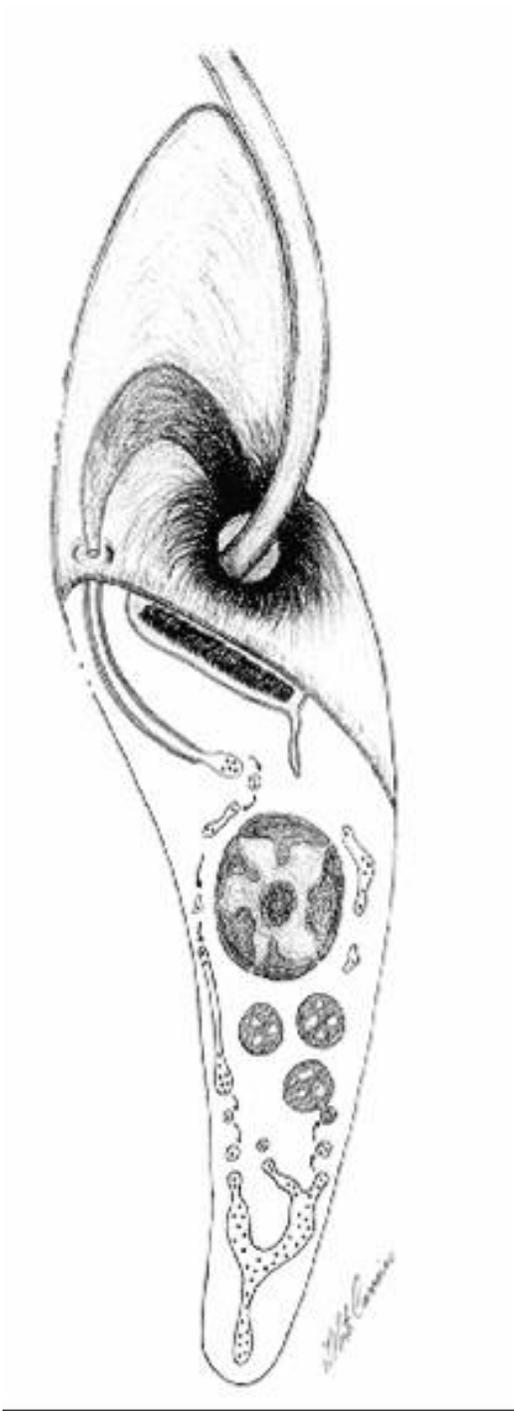


Figura 3 – Desenho esquemático mostrando a provável distribuição da via endocítica na forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. O material é endocitado na bolsa flagelar e majoritariamente no citóstoma. Vesículas brotariam a partir destas estruturas, percorreriam a região perinuclear e posterior, formando estruturas tubulares (caracterizados como estruturas iniciais da via endocítica), e posteriormente fundindo-se com reservossomos (Porto-Carreiro *et al*, 2000).

1.5.2 - Reservossomos

Os reservossomos são grandes organelas citoplasmáticas presentes exclusivamente nos membros do subgênero *Schyzotrypanum*, assim como o *T. cruzi*, *T. vespertilionis* e *T. dionisii*. Eles são estruturas arredondadas com um diâmetro que varia de 0.4-0.6 μ m e estão localizados na porção posterior das formas epimastigotas, não sendo encontrados nas formas tripomastigotas e amastigotas (Soares e De Souza, 1988). Estas organelas são sítios de acúmulo de nutrientes capturados pelos parasitas através do processo endocítico e, devido a esta característica, receberam o nome de reservossomos (Soares e De Souza, 1988). São envolvidas por uma unidade de membrana e apresentam no seu interior uma matriz elétron-densa, assim como inclusões eletrônicas. Análises por técnicas citoquímicas realizadas posteriormente mostraram que a matriz é constituída por proteínas e suas inclusões correspondem a lipídios (Soares & De Souza, 1988). Devido à sua estrutura interna e observações destas organelas a partir de células fixadas por congelamento rápido seguido de criofatura os reservossomos foram primeiramente caracterizados como corpos multivesiculares (De Souza, 1978), pois se mostrou que estas inclusões lipídicas estavam envoltas por unidades de membrana. Posteriormente, Soares e colaboradores (1988), por análises de epimastigotas fixados quimicamente e processados para rotina em microscopia eletrônica de transmissão não observaram a presença de membranas internas nos reservossomos. Porém, dados recentes de nosso grupo, utilizando a observação de cortes ultrafinos e da técnica de contrastação negativa, mostraram a presença de perfis de membranas internas que na verdade se apresentavam como grandes membranas planares preenchendo todo o interior dos reservossomos (Sant'Anna, Tese Doutorado, IBCCF).

Recentemente nosso grupo identificou a presença de estruturas semelhantes a grandes bastões eletrólucos presentes em seu interior. Em cortes ultrafinos, estes bastões apresentam um envoltório constituído por uma única camada de membrana. Porém, a natureza e função destas estruturas peculiares ainda necessita ser esclarecida (Sant'Anna, Tese Doutorado, IBCCF).

Os reservossomos foram caracterizados como compartimentos pré-lisossomais ou endossomas tardios devido à análise de alguns fatores como a ausência de reação para fosfatase ácida, a ausência de marcação imunocitoquímica para glicoproteínas de membrana lisossomal (LAMP-1, LAMP-2 e lgp 120) e a estimativa do pH, feita através da técnica do DAMP (base fraca que se acumula em compartimentos acídicos), onde estas organelas apresentaram pH 6.0 (Soares *et al.*, 1992). Recentemente Adade e colaboradores (2007), mostraram através de análises por citoquímica que a enzima aril sulfatase, marcadora de lisossomos, não está localizada nos reservossomos.

Estudos estereológicos demonstraram que os reservossomos ocupam cerca de 5% do volume total dos epimastigotas e que durante o processo de metaciclogênese desaparecem gradativamente estando ausentes nas formas tripomastigotas (Soares *et al.*, 1989). Verificou-se primeiramente o desaparecimento das inclusões lipídicas e, posteriormente, a matriz protéica tornar-se menos densa, sugerindo a utilização do seu conteúdo na diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota (Soares *et al.*, 1989). A grande dificuldade no estudo dos reservossomos é a ausência de um marcador molecular, sendo usado então apenas o acúmulo de traçadores endocíticos e análises morfológicas para a identificação desta estrutura. Um promissor candidato para a função de marcador molecular do reservossomo era a GTPase monomérica TcRab7, homóloga ao marcador de endossomas tardios, Rab7, em célula de mamíferos. No entanto, em *T. cruzi* a

TcRab7 foi encontrada concentrada no complexo de Golgi (Araripe *et al.*, 2004). Porém, inesperadamente, a TcRab11, GTPase monomérica homóloga a Rab11 presente nos endossomas de reciclagem de células de mamíferos, foi encontrada nos reservossomos (Mendonça *et al.*, 2000), sugerindo um possível papel destas estruturas nos processos de retorno à superfície do parasita de material endocitado, receptores e proteínas de membrana. Os estudos iniciais sobre os reservossomos baseavam-se em análises por microscopia óptica e eletrônica, e pouco se sabia sobre a composição bioquímica dessas organelas. Em 2002, Cunha-e-Silva e colaboradores utilizando técnicas de fracionamento celular obtiveram uma fração purificada de reservossomos cuja caracterização bioquímica inicial revelou a presença de proteínas como glutathione S-transferase, cisteína proteinase e TcRab11 (Ouaisi *et al.*, 1995, Souto-Padrón *et al.*, 1990, Mendonça *et al.*, 1999). Através da análise do gel de substrato observou-se que a cisteína protease permanece ativa nos reservossomos purificados. A cromatografia de camada fina mostrou que o acúmulo de lipídeos nos epimastigotas se dá nos reservossomos, uma vez que a relação lipídeo/proteína encontrada na fração isolada foi de 2:1, enquanto que o epimastigota inteiro apresenta uma relação lipídeo/proteína de 1:1.

Recentemente, Torres e colaboradores (2004) caracterizaram e imunolocalizaram um transportador semelhante a ABCA em *T. cruzi*. Este transportador pertence à família de transportadores ABC, responsáveis pelo transporte de vários substratos através da membrana, em um processo dependente de ATP. Em células de mamíferos esses transportadores estão envolvidos nas vias endocítica e secretória e no fluxo de colesterol e fosfolipídios. No *T. cruzi*, o transportador ABCA é codificado por gene de cópia única e está expresso somente nas formas epimastigotas e amastigotas. Eles possuem um papel funcional nas vias endocítica e secretória e estão localizados na membrana plasmática, na

membrana do flagelo e nas organelas da via endocítica, incluindo os reservossomos, o que leva a uma perspectiva pra uma nova função dos reservossomos. Recentemente foi sugerido através de experimentos de captação de um análogo fluorescente de heme, a mesoporfirina-paládio, por epimastigotas tratados com inibidores de transportadores ABC, que o heme é captado através da membrana plasmática e posteriormente acumulado nos reservossomos, por um segundo transportador ainda desconhecido (Lara *et al.*, 2007).

Nos reservossomos também se dá o acúmulo da cisteína protease cruzipaína, a hidrolase lisossomal de maior atividade proteolítica no *T. cruzi* (Souto-Padrón *et al.*, 1990; Soares *et al.*, 1992; Engel *et al.*, 1998a; 2000; Cazzulo *et al.*, 1997) e se encontra ativa nesta organela (Cunha-e-Silva *et al.*, 2002). A atividade da cruzipaína possui um papel importante relacionado à virulência e ao crescimento intracelular do parasito. Recentemente, demonstrou-se que um inibidor natural da cruzipaína, a chagasina, também se acumula nos reservossomos, possivelmente realizando a regulação da atividade da cruzipaína (Santos *et al.* 2005).

Reservossomos estão presentes apenas nas formas epimastigotas, assim é muito interessante investigar o que acontece com a organela durante a diferenciação para tripomastigotas. Trabalhos anteriores mostraram que essas organelas modificam seu conteúdo, que se torna mais eletrólucida (Soares *et al.*, 1989), antes de desaparecer completamente (Figueiredo *et al.*, 1994). Porém, dados recentes de nosso grupo mostraram a presença de organelas relacionadas a lisossomos (LRO) em formas tripomastigotas e amastigotas. A reconstrução 3D mostrou que estas estruturas estão presentes em grande número concentradas entre o núcleo e o cineplasto de formas tripomastigotas e possuem aspecto morfológico mais homogêneo quando comparadas aos mesmo compartimentos em amastigotas. Nas formas amastigotas foram observadas organelas com morfologia

extremamente heterogênea em tamanho e aspecto localizadas na região posterior. Essas organelas relacionadas a lisossomos apresentavam marcação para enzimas que normalmente se encontram concentradas em reservossomos de epimastigotas, como a cruzipaína e a serino carboxipeptidase, e a marcação, em alguns compartimentos, de chagasina. Também se observou a presença de H⁺-ATPases do tipo P. Através da incubação com LysoTracker foi determinado que essas organelas apresentam um caráter ácido semelhante aos reservossomos de epimastigotas. No entanto, essas organelas não possuem acessibilidade a traçadores endocíticos, não podendo ser caracterizadas como reservossomos.

Tais características dos reservossomos mostram a importância desta organela na biologia do *T. cruzi*, pois ela está intimamente envolvida em dois processos críticos e fundamentais para o parasita: a nutrição e a diferenciação celular.

1.6 - Cruzipaína - A cisteíno-protease majoritária do *T. cruzi*

As cisteíno-proteases (CP) são enzimas que se encontram presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos e foram agrupadas em distintos clãs e superfamílias, de acordo com semelhanças estruturais e funcionais (Barret *et al*, 2004).

No *T. cruzi* encontramos uma cisteíno-protease da superfamília da papaína, denominada cruzipaína (CZP), responsável pela atividade proteolítica majoritária nesse parasito (Cazzulo *et al.*, 1989; Murta *et al.*, 1990, Eakin *et al.*, 1992; 1993), e que possui um papel importante na sua sobrevivência na célula infectada, na infecção e no processo de diferenciação deste parasito (Meirelles *et al.*, 1992; McKerrow *et al.*, 1995). A cruzipaína apresenta uma expressão abundante em todas as formas do ciclo de vida do *T. cruzi*, mas é

controlada durante o desenvolvimento, sendo mais expressa nas formas multiplicativas, principalmente na forma epimastigota, e cuja expressão independe dos níveis de RNAm, sendo regulada pós-traducionalmente, por mecanismos ainda não completamente caracterizados (Campetella *et al.*, 1990; Tomás e Kelly, 1996). Esta enzima está localizada preferencialmente nos reservossomos em formas epimastigotas (Soares *et al.*, 1992). Assim como as CPs de mamíferos, a seqüência primária da cruzipaína é formada por uma cadeia polipeptídica única, sintetizada sob a forma de pré-pró-proteína. A região pré é formada por um peptídeo sinal, hidrofóbico, com 18 aminoácidos, que é responsável pelo direcionamento para o retículo endoplasmático. Este peptídeo é removido por peptidase de sinal durante o processo de translocação pela membrana da organela. A região pró mantém a enzima sob a forma inativa até o momento de sua maturação e sua remoção. Reis e colaboradores (2007) mostraram que o pró-peptídeo é capaz de atuar como um potente inibidor da cruzipaína madura. Além de servir como inibidor, o pró-peptídeo também pode estar envolvido com o correto enovelamento da enzima recém sintetizada (Tao *et al.*, 1994). Engel e colaboradores (1998b) mostraram que o cultivo de epimastigotas de *T. cruzi* na presença de inibidores sintéticos irreversíveis de cisteíno-proteases levou à inibição da cruzipaína ativa e ao aumento do acúmulo de pró-cruzipaína no Golgi, sugerindo que a maturação destes precursores ocorra por autocatálise e seja um pré-requisito para o tráfego correto da enzima para os reservossomos. Estes inibidores também causam a interrupção da replicação de epimastigotas, da multiplicação e diferenciação de amastigotas, e o bloqueio parcial da invasão de células hospedeiras por tripomastigotas (Meirelles *et al.*, 1992; Harth *et al.*, 1993; Engel *et al.*, 1998a; Selzer *et al.*, 1999). Estudos utilizando parasitas transfectados que super-expressavam a isoforma majoritária da cruzipaína revelaram um aumento na taxa de metaciclogênese destes mutantes, indicando um possível papel da

enzima no processo de diferenciação do *T. cruzi* (Tomás *et al.*, 1997). Duschak e colaboradores (2006) mostraram uma nova cisteína-protease durante o processo de metaciclogênese do *T. cruzi*, denominada TcCPmet, reforçando o importante papel dessas enzimas no processo de diferenciação. Sabe-se que o conteúdo protéico das formas epimastigotas é maior do que o encontrado em formas tripomastigotas, por isso, neste trabalho os autores sugerem que a TcCPmet possa estar envolvida, juntamente com outras enzimas, no processo de degradação de proteínas necessárias para essa transformação estágio-específica. Através de ensaios enzimáticos verificou-se que a TcCPmet possui as mesmas características de outras CPs, como atividade de endopeptidase e sensibilidade aos mesmos inibidores. Por outro lado, imunoenaios com anticorpos específicos anti-CZP mostraram que não há reação cruzada, confirmando que a TcCPmet é uma nova cisteína-protease diferente da cruzipaina. Neste trabalho os autores também sugerem que a presença dessa nova CP no processo de diferenciação pode constituir um alvo promissor para quimioterapia.

1.7- Chagasina – O inibidor natural da cruzipaina

Durante muito tempo, vários estudos foram desenvolvidos na tentativa de se entender os processos celulares que estariam envolvidos no processo de degradação de proteínas e no mecanismo de regulação da atividade proteolítica das enzimas. Este controle enzimático é feito normalmente por ativação de pró-enzimas, regulação na expressão e secreção, por degradação específica de enzimas maduras, ou por bloqueio da atividade proteolítica por inibidores (Dubin, 2005, e Rzychon *et al.*, 2004). Diversos inibidores de várias classes de CPs já foram caracterizados, entretanto, nenhum deles são encontrados no

genoma dos tripanosomatídeos. A primeira evidência da presença de inibidores de CP do tipo papaína foi descrita em ensaios bioquímicos realizados em extratos de *Leishmania mexicana*, *T. brucei*, *Tritrichomonas foetus* e *Toxoplasma gondii* (Irvine *et al.*, 1992). Recentemente foi identificado e caracterizado um inibidor endógeno de cisteíno-proteases em *T. cruzi*, denominado chagasina (Monteiro *et al.*, 2001). A chagasina é um inibidor reversível de CPs da família da papaína, de alta-afinidade, resistente a fervura e que possui uma massa molecular de cerca de 12 kDa. Ensaios bioquímicos utilizando a chagasina purificada e/ou recombinante revelaram que ela é um potente inibidor capaz de se ligar não só à cruzipaina, mas também a outros membros da superfamília da papaína (Monteiro *et al.*, 2001). A chagasina é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*, sendo mais abundante na forma tripomastigota do que nas formas amastigotas e epimastigotas (Monteiro *et al.*, 2001). Sanderson e colaboradores (2003) identificaram seqüências gênicas homólogas à chagasina, denominados ICP, em *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei* e *Pseudomonas aeruginosa* que codificam inibidores funcionais e apresentam propriedades similares a chagasina. Recentemente estes ICPs funcionais também foram caracterizados em *Entamoeba histolytica* (Riekenberg *et al.*, 2005; Saric *et al.*, 2006) e em *Plasmodium falciparum* (Pandey *et al.*, 2006).

Recentemente, a estrutura tridimensional da chagasina foi resolvida por ressonância magnética nuclear (RMN) (Salmon *et al.*, 2006) e por cristalografia de raios-X (Figueiredo da Silva *et al.*, 2007). Ela é composta por 8 fitas- β conectadas por 6 loops e 2 hélices, organizadas em duas folhas- β , em um formato semelhante a imunoglobulina (Salmon *et al.*, 2006; Figueiredo da Silva *et al.*, 2007). Também foi visto por RMN que a chagasina

apresenta o loop 4 flexível, que sugere-se ser importante para uma melhor adaptação do inibidor a ligação as cisteíno-proteases (Salmon *et al.*, 2006).

Estudos ultraestruturais revelaram que a chagasina e a cruzipaína co-localizam no complexo de Golgi e nos reservossomos nas formas epimastigotas (Santos *et al.*, 2005).

2- Racional

Muito se tem discutido e pesquisado sobre a metaciclologênese, um processo fundamental para o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Após o estabelecimento de um protocolo por Contreras e colaboradores (1985) onde este processo de diferenciação pôde ser reproduzido *in vitro* houve vários avanços no entendimento deste processo. Um dos aspectos que suscita muitas dúvidas é a relação entre o processo endocítico das formas epimastigotas e a metaciclologênese. Já havia sido descrito por Soares e De Souza (1988) que os reservossomos de formas epimastigotas durante o processo de transformação em tripomastigotas metacíclicos sofrem um processo gradativo de transformação culminando com o seu “desaparecimento” ou transformação em alguma organela não estruturalmente correlacionada. Adiciona-se a este relato aquele feito por Figueiredo e colaboradores (2000) que demonstrou que a adição do complexo transferrina-ouro ao meio de diferenciação TAU3AAG bloqueava a metaciclologênese sugerindo que o preenchimento dos reservossomos com um traçador poderia impedir o processo de metaciclologênese. A partir desses dados e de observações feitas ao longo do tempo pelo nosso grupo, resolvemos analisar o que aconteceria se carregássemos previamente os reservossomos com os traçadores endocíticos e posteriormente submetêssemos os parasitas ao processo de diferenciação. Será que desta maneira o processo de metaciclologênese seria inibido? E qual seria o destino final do material endocitado?

Nos experimentos de metaciclologênese também analisamos as formas intermediárias que possuem grande importância neste tipo de avaliação por representarem um elo entre as duas formas evolutivas, apresentando características de ambas as formas.

A terceira questão importante é avaliar a expressão, atividade e localização da cruzipaina e de seu inibidor natural, a chagasina, que se localizam preferencialmente nos reservatórios de formas epimastigotas e desempenham importante papel no ciclo de vida do *T. cruzi* (Cazzulo *et al.*, 1989; Meirelles *et al.*, 1992; Monteiro *et al.*, 2001). Sabe-se que a cruzipaina e a chagasina estão expressas em formas epimastigotas e tripomastigotas e que a quantidade das duas proteínas é inversamente proporcional em cada um dos estágios de desenvolvimento (Tomás & Kelly, 1996 ; Monteiro *et al.*, 2001). Porém, nada se sabe como essas proteínas se comportam durante o processo de diferenciação epimastigota para tripomastigota e principalmente qual é o verdadeiro papel das formas intermediárias.

3 – Objetivos

Objetivo geral:

- Estudar o destino dos reservossomos e do seu conteúdo no processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas.

Objetivos específicos:

- Verificar se o acúmulo de material endocitado em formas epimastigotas inibe o processo de metaciclogênese;
- Analisar ultraestruturalmente os parasitas no processo de metaciclogênese;
- Analisar o destino dos traçadores após a metaciclogênese observando formas intermediárias e formas tripomastigotas;
- Verificar a expressão, atividade e a distribuição da cruzipaína e da chagasina durante o processo de diferenciação.

4 - Materiais e Métodos

4.1- Parasitas

Formas epimastigotas do clone Dm28c do *Trypanosoma cruzi* foram axênicamente cultivadas em meio LIT B suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 4 dias a 28 °C. O meio LIT B é um meio LIT modificado (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964) composto por: 68 mM NaCl, 5 mM KCl, 11 mM Glicose, 5g/L Triptose, 5g/L Infusão de fígado, 46 mM Na₂HPO₄ e 15g/L extrato de levedura.

4.2- Metaciclologênese in vitro

Epimastigotas com seis dias de crescimento foram coletados através de centrifugação a 2000 x g por 10 minutos, ressuspensos em meio TAU (urina artificial de triatomínio) (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 8 mM tampão fosfato de sódio pH 6.0), na densidade de 5 x 10⁸ células/mL e incubados durante 2 h a 28° C. Subseqüentemente, os parasitas foram incubados em meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 20 mM L-prolina, , 50mM ácido glutâmico, 2mM ácido aspártico e 10 mM glicose) na densidade final de 5 x 10⁶ células/mL durante 4 dias a 28° C (Contreras *et al.*, 1985). Parasitas foram coletados em diferentes tempos da metaciclologênese (24, 48, 72 e 96 horas) e a partir daí, o percentual de diferenciação foi analisado através da contagem de formas epimastigotas, tripomastigotas e formas intermediárias. Formas tripomastigotas foram isoladas através de coluna em lã de vidro.

4.3- Contagem diferencial

Alíquotas de cada um dos diferentes tempos da metaciclologênese foram centrifugadas e ressuspensas em PBS (50mM NaCl em 10 mM tampão fosfato de sódio, pH 7.3), foi realizado então o esfregaço em lâminas que foram posteriormente coradas por Panótico rápido (Laborclin) de acordo com as instruções do fabricante. Por esta técnica o cinetoplasto e o núcleo são corados, o que nos permite uma boa discriminação das formas epimastigotas, tripomastigotas e das formas intermediárias.

4.4- Ensaios de Endocitose associados à metaciclologênese

Formas epimastigotas foram lavadas em PBS e ressuspensas em meio LIT sem soro contendo os seguintes traçadores endocíticos fluorescentes: Albumina bovina conjugada a Alexa-488 (BSA-Alexa 488) 20µg/mL, Transferrina conjugada a Alexa-546 (Tf-Alexa 546) (Molecular probes) na diluição de 1:500 e microesferas de poliestireno fluorescentes de 100nm (Molecular probes) na diluição de 1:200 por 30 minutos a 28 °C. O material foi então lavado em PBS por três vezes para retirada dos traçadores. Posteriormente os parasitas foram incubados com meio LIT com soro para que os traçadores se acumulem apenas nos reservossomos. Este material foi então, observado no microscópio óptico de fluorescência para análise e contagem do número de células marcadas. Este número foi obtido através da contagem de 200 células em campos distintos da lâmina. A partir deste número foi calculado o percentual de endocitose. A partir daí essas formas epimastigotas seguem o processo de metaciclologênese *in vitro*. Os pontos da metaciclologênese foram

coletados a cada 24 horas e analisados por contagem diferencial, microscopia de fluorescência para observação do destino dos traçadores.

4.5 – Anticorpos

Os seguintes anticorpos primários foram usados neste estudo:

Anticorpo	Antígeno	Animal	Referência
Anti-Cruzipaína ¹	Proteína purificada	Coelho	Campetella <i>et al.</i> , 1990
Anti-pró-cruzipaína ²	Proteína recombinante	Camundongo	Reis <i>et al.</i> , 2007
Anti-Chagasina ²	Proteína recombinante	Coelho	Monteiro <i>et al.</i> , 2001

¹ - gentilmente cedido pelo Dr. J. J. Cazzulo

² - gentilmente cedido pela Dra Ana Paula Lima

4.6- Microscopia óptica - Imunofluorescência

Os parasitas foram centrifugados, lavados em PBS e fixados em paraformaldeído 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, os parasitas foram aderidos por 15 minutos a lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina 0,1%. Então, as amostras foram incubadas em 50 mM de cloreto de amônio em PBS por 30 minutos, a fim de bloquear os grupamentos aldeídicos livres. Depois disso, foram incubados em PBS pH 8,0 suplementado com albumina bovina 1,5% e gelatina de peixe 0,5%, (tampão de bloqueio) por 1 hora a temperatura ambiente. Os anticorpos primários anti-cruzipaína na diluição de 1:1000 e anti-chagasina na diluição de 1:100 foram adicionados aos parasitas, que foram então incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Os controles foram feitos

substituindo os anticorpos primários por tampão de bloqueio. Depois de lavadas em tampão de bloqueio as amostras foram incubadas com anticorpos secundários conjugados a Alexa-546nm e Alexa-488 (Molecular probes) diluídos 1:400 por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas com DAPI 200µg/mL por 5 minutos (para corar núcleo e cinetoplasto), lavadas, montadas com N-propilgalato 0,2M em glicerol:PBS (9:1) e finalmente foram observadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan acoplado a uma câmera CCD Hamamatsu C5810.

4.7- Microscopia eletrônica de transmissão

Parasitas foram fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% / ferrocianeto de potássio 0,8%, cloreto de cálcio 5 mM, tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, desidratados em série crescente de acetona e incluídas em resina epoxi PoliBed. Seções ultrafinas foram coradas com acetato de uranila 5% em água por 40 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos e examinadas ao microscópio eletrônico Zeiss EM 900 equipado com uma câmera Mega view III (Olympus) ou JEOL 1200 através de negativos. Depois de revelados, os negativos fotográficos foram digitalizados em scanner Epson.

4.8- Obtenção do extrato protéico dos parasitas

Formas epimastigotas, tripomastigotas e parasitos obtidos após 24, 48, 72 e 96 horas de metaciclogênese foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2, ressuspensos no mesmo tampão e congelados. Nas amostras para análise por western blot foi adicionado coquetel de inibidor de protease (Sigma–Aldrich) que foi omitido nas amostras para dosagens

enzimáticas. A dosagem protéica foi realizada através do método de Lowry (Lowry et al., 1951).

4.9- Análise por Western blot

O lisado total de epimastigotas, tripomastigotas e parasitos obtidos após 24, 48, 72 e 96 horas de metaciclo-gênese preparados como mencionado anteriormente foram ressuspensos em tampão 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS (v/v), 10% 2-mercaptoetanol (v/v), 0,012% glicerol, azul de bromofenol e fervidos por 5 minutos e aplicados sobre um gel de SDS-PAGE, nas seguintes condições: para detecção de cruzipaina e pró-cruzipaina utilizamos 30µg de proteína de cada amostra em um mini gel de poliacrilamida 11%, gel de concentração 3,5% a temperatura ambiente. Para detecção de chagasina utilizamos 100µg de proteína de cada amostra em um gel de poliacrilamida 14%, gel de concentração 3,5% a temperatura ambiente. Depois de separadas por eletroforese, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose em uma cuba (BioRad), por 100 minutos em tampão Tris-glicina e 20% metanol. Posteriormente as membranas foram bloqueadas em solução de leite em pó desnatado (Molico) 9% em TBS-Tween 20 (Tris 10mM, NaCl 190mM, Tween 20 0,05% (v/v)) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários: anti-cruzipaina na diluição de 1:1000, anti-pró-cruzipaina na diluição de 1:100 e anti-chagasina na diluição de 1:100. As membranas foram lavadas em tampão de bloqueio e incubadas com os seguintes anticorpos secundários: anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase para detecção de cruzipaina e pró-cruzipaina, e anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (Sigma Chemical Co.) para detecção de chagasina. A marcação será revelada usando o kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) para CZP e pró-CZP, de acordo com as instruções do fabricante. Para revelação da chagasina as membranas foram

incubadas com o substrato da fosfatase alcalina NBT/BCIP (Pierce Biochemistry). A reação foi parada com H₂O destilada. Os dados de western blot foram então analisados por densitometria através do programa Image Total Lab software, USA e os resultados obtidos transformados em gráficos.

4.10- Dosagem enzimática da cruzipaina e da atividade inibitória da chagasina durante o processo de metaciclogênese

Para determinação da atividade proteolítica de cisteína proteases (CP) ativas e da atividade de seu inibidor nos lisados de amostras durante o processo de metaciclogênese, foram obtidos extratos protéicos brutos que foram analisados por ensaio fluorimétrico. Neste ensaio os lisados totais dos parasitos foram testados para atividade de CP em 50 mM Na₂PO₄, 0.2 M NaCl, 2 mM EDTA, pH 6,5, 2,5 mM ditioneitol (DTT), 5% dimetil sulfóxido (DMSO) a temperatura ambiente, utilizando 5µM do peptídeo sintético fluorogênico Z-Phe-Arg-MCA (Sigma-aldrich, USA) como substrato. A hidrólise do substrato é monitorada continuamente em um espectrofluorímetro F4500 (Hitachi) a 380nm excitação e 440nm emissão. A regressão linear da curva de hidrólise do substrato foi usada para calcular as velocidades iniciais da atividade da enzima, como descrito em Lima et al., 2001. Para determinação da atividade inibitória da chagasina, os lisados foram fervidos por 5 minutos e centrifugados a 10.000g por 10 minutos a 4°C. O material solúvel foi coletado e incubado com 3,32 nM papaina (previamente titulada com E-64, como descrito por Abrahamson, 1994), em 50 mM Na₂PO₄, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 6,5, 2,5 mM DTT, por 20 minutos a temperatura ambiente. A atividade restante foi medida pela adição

do substrato Z-Phe-Arg-MCA em uma concentração final de 5 μ M como descrito anteriormente.

5- Resultados

5.1- Metaciclologênese de *Trypanosoma cruzi in vitro*

Visando a obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas, epimastigotas cultivados em meio LIT B na concentração de 5×10^8 células/mL foram transferidos para o meio TAU3AAG na concentração de 5×10^6 células/mL e acompanhados diariamente por 24, 48, 72 e 96 horas. Após o período de incubação no meio de diferenciação, o sobrenadante das garrafas contendo formas tripomastigotas, epimastigotas e intermediárias é coletado e analisado. A coloração pelo método do Panótico Rápido nos permitiu a identificação dos diferentes estágios de desenvolvimento por alteração do corpo celular e posição relativa do núcleo e do cinetoplasto. Através da observação dessas amostras classificamos em três grupos distintos: 1) formas epimastigotas; 2) formas tripomastigotas; 3) e formas intermediárias, que apresentam o corpo alongado, núcleo arredondado e cinetoplasto em forma de bastão localizado lateralmente ao núcleo (Figura 1). Contagens diferenciais das amostras de metaciclologênese mostraram que após 24 horas de diferenciação cerca de 25% da população é composta por formas tripomastigotas, cujo número aumenta com o passar do tempo chegando a cerca de 60% após 96 horas. As formas intermediárias apresentam, porém, uma porcentagem praticamente constante ao longo do tempo de diferenciação alcançando valores de 35%. As formas epimastigotas diminuem ao longo desse processo, apresentando no tempo de 96 horas valores de 25% (Figura 2).

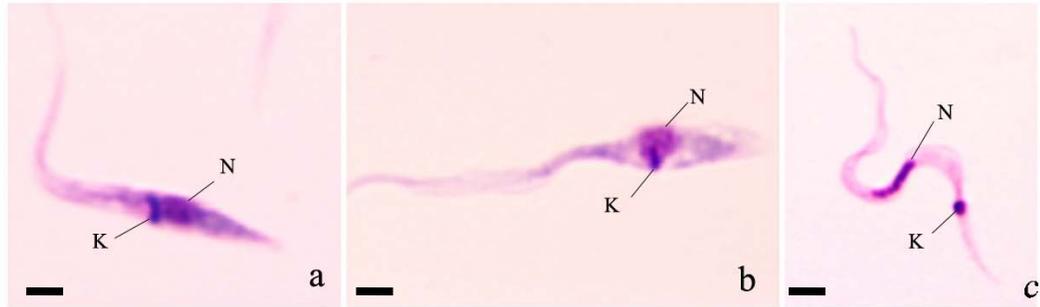


Figura 1: Microscopia óptica de parasitos obtidos durante o processo de metaciclogênese “*in vitro*”

Podemos observar os três estágios do desenvolvimento originados no processo de metaciclogênese: a) forma epimastigota apresentando núcleo arredondado e cinetoplasto em forma de bastão localizado na região antero-lateral; b) forma intermediária apresentando núcleo arredondado e cinetoplasto em forma de bastão, localizado lateralmente ao núcleo; c) forma tripomastigota apresentando núcleo alongado e cinetoplasto arredondado localizado na região posterior. N- núcleo; K- cinetoplasto. Barras: 2 μ m

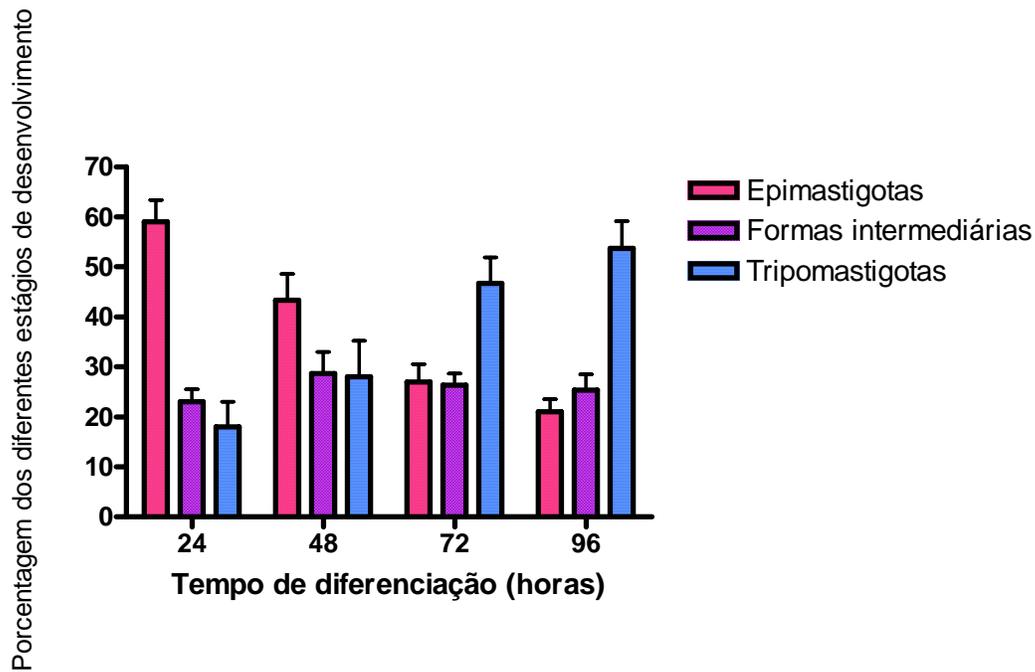


Figura 2: Porcentagem de estágios do desenvolvimento ao longo do processo de metaciclologênese “*in vitro*” no experimento controle

Diferenciação de formas epimastigotas para formas tripomastigotas em meio TAU3AAG. Podemos observar uma taxa de diferenciação de cerca de 60% no tempo de 96 horas. Experimentos realizados em triplicata. A análise de variância foi determinada pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls, mostrando que as variações entre os valores de formas epimastigotas e tripomastigotas são significativas ($p < 0,05$), enquanto que nas formas intermediárias a diferença não é significativa ($p > 0,05$).

5.2- Ultra-estrutura de parasitas no processo de metacicloênese “*in vitro*”.

Para analisar a ultra-estrutura de parasitas no processo de diferenciação, cortes ultrafinos foram observados (Figura 3). É importante ressaltar que em todos os tempos de diferenciação encontramos formas epimastigotas, intermediárias e tripomastigotas, e que esse processo não é sincronizado, não sendo relevante então, o tempo de diferenciação das imagens aqui apresentadas. Nas formas intermediárias observamos o reposicionamento de estruturas da célula, como por exemplo, o cinetoplasto, citóstoma e reservossomos. Nestes parasitas também observamos que o citóstoma, estrutura típica de formas epimastigotas, permanece em um período do processo de diferenciação (Figura 3a), sendo encontrado até mesmo em estágios mais avançados da diferenciação, onde o cinetoplasto se encontra posteriormente ao núcleo (Figuras 3b, c). Nas formas intermediárias também encontramos estruturas típicas de formas tripomastigotas, como, por exemplo, a presença de inclusões lipídicas no citoplasma (Figura 3e). Na figura 3d observamos um fato interessante onde um reservossomo parece se fundir com a membrana plasmática sugerindo um possível processo de exocitose. Outro dado interessante obtido com a observação desses parasitas é a transformação do cinetoplasto durante a diferenciação. Observamos que a migração do cinetoplasto precede a sua reorganização de formato de bastão para formato de cesta encontrado nas formas tripomastigotas, sugerindo que essa alteração morfológica do cinetoplasto só comece a ocorrer quando ele já se encontra na região posterior da célula (Figuras 4 e 5). O estudo dessas formas intermediárias se mostra bastante interessante, pois elas apresentam estruturas características tanto de formas epimastigotas quanto de formas tripomastigotas. Com isso, somente a análise dessas formas irá fornecer respostas sobre o processo de alteração ultra-estrutural que ocorre neste processo.

Figura 3: Ultra-estrutura de formas intermediárias obtidas durante a metacicloênese “*in vitro*”.

a – Forma intermediária com cinetoplasto (K) em forma de bastão localizado lateralmente ao núcleo, que ainda apresenta estruturas típicas de epimastigotas, como por exemplo, o citóstoma (seta). Observamos ainda a presença de reservossomos (R). **b** – Forma intermediária em um estágio um pouco mais avançado da migração do cinetoplasto ainda apresentando citóstoma (seta). **c** – Forma intermediária com cinetoplasto em forma de bastão localizado posteriormente ao núcleo onde ainda podemos observar a presença do citóstoma (seta). **d** – Forma intermediária mostrando a possível fusão de um reservossomo com a membrana plasmática (seta). **e** – Forma intermediária apresentando estruturas típicas de epimastigotas, como reservossomos, juntamente com aglomerados lipídicos (seta), típicos de tripomastigotas. N - núcleo; K - cinetoplasto; R – reservossomo; C – citóstoma.

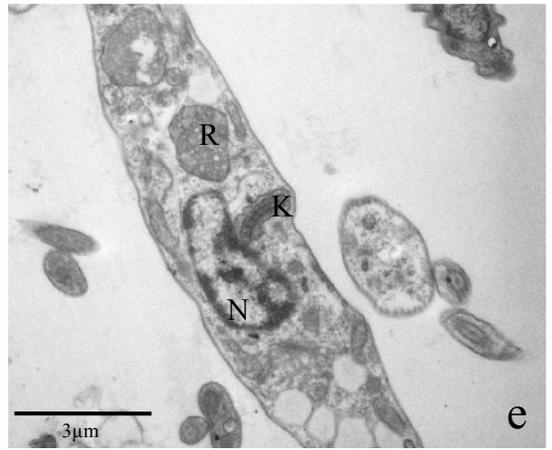
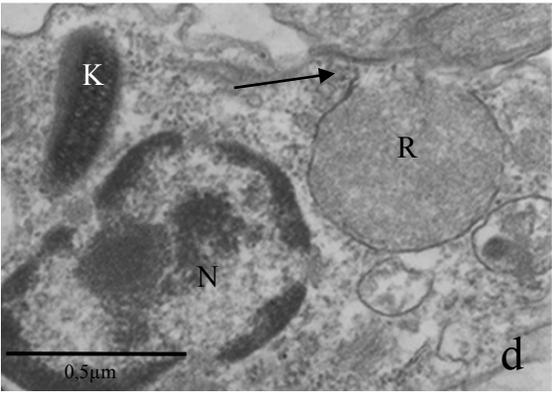
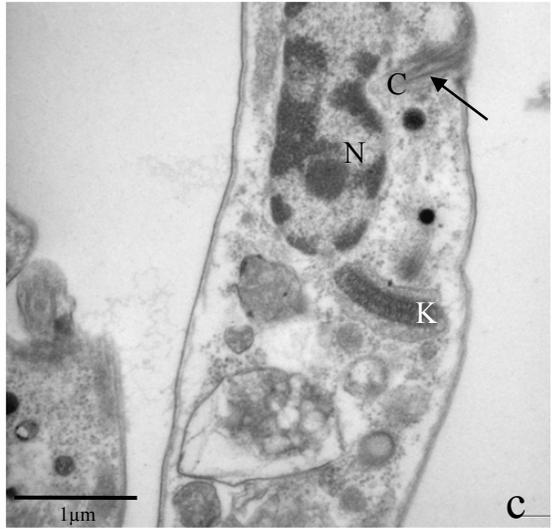
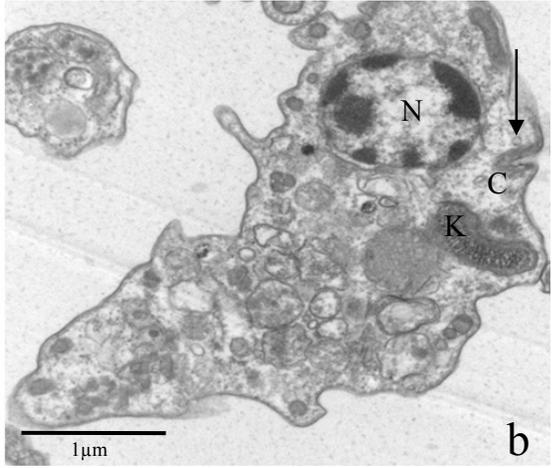
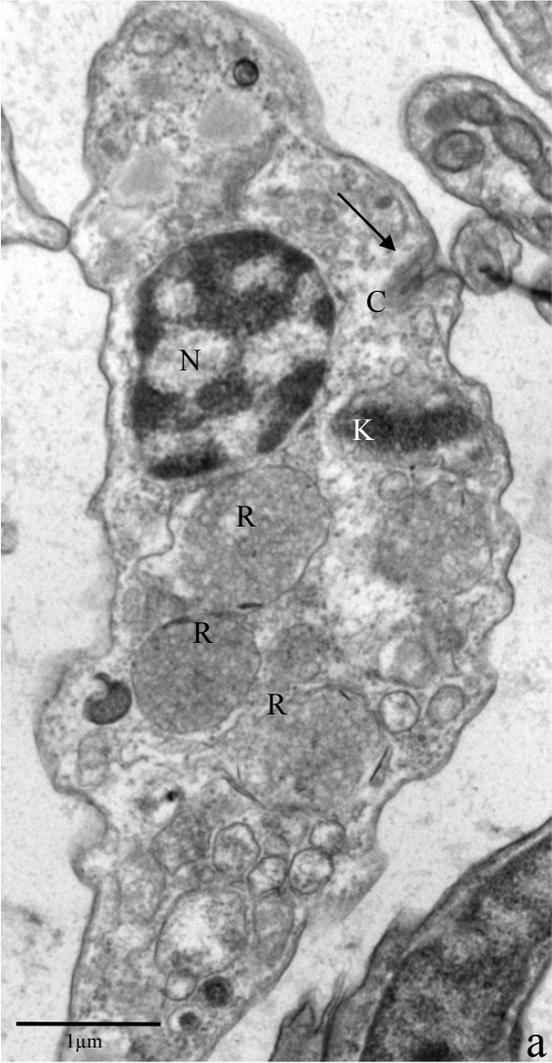


Figura 4: Ultra-estrutura de formas intermediárias obtidas durante a metaciclologênese “*in vitro*”.

a – Forma intermediária mostrando o início da reorganização do cinetoplasto que ainda possui formato de bastão e se localiza lateralmente ao núcleo (seta). **b, c** – Forma intermediária mostrando a migração do cinetoplasto e do núcleo. **d** – Estágio um pouco mais avançado da migração do cinetoplasto que ainda conserva o formato de bastão e se localiza lateralmente a porção final do núcleo (seta). N - núcleo; K - cinetoplasto; R – reservossomo; F – flagelo.

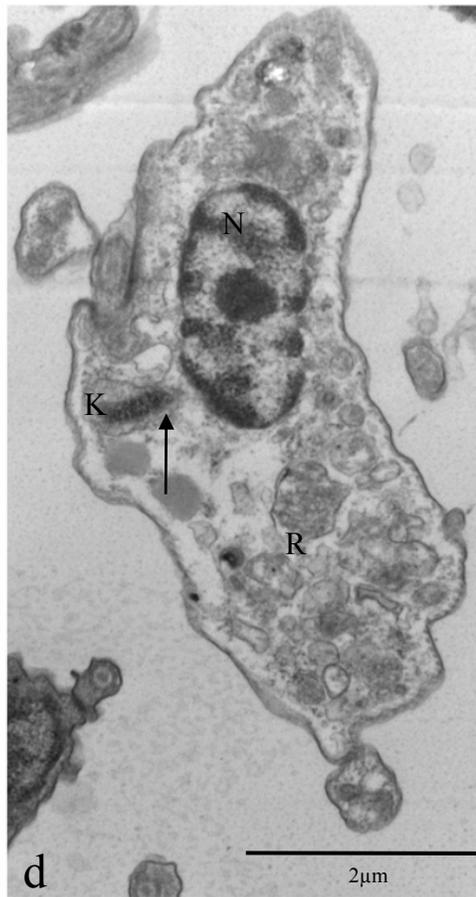
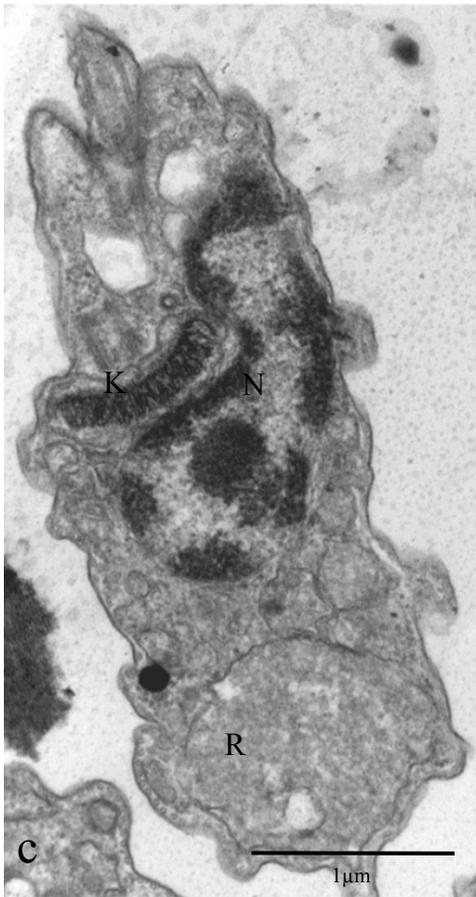
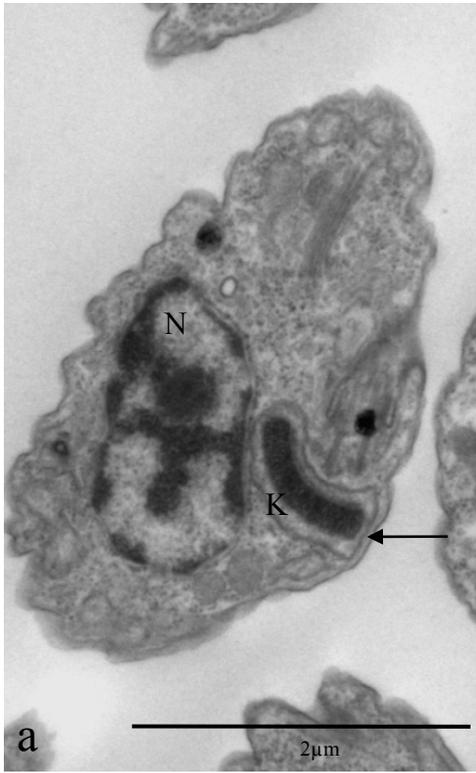
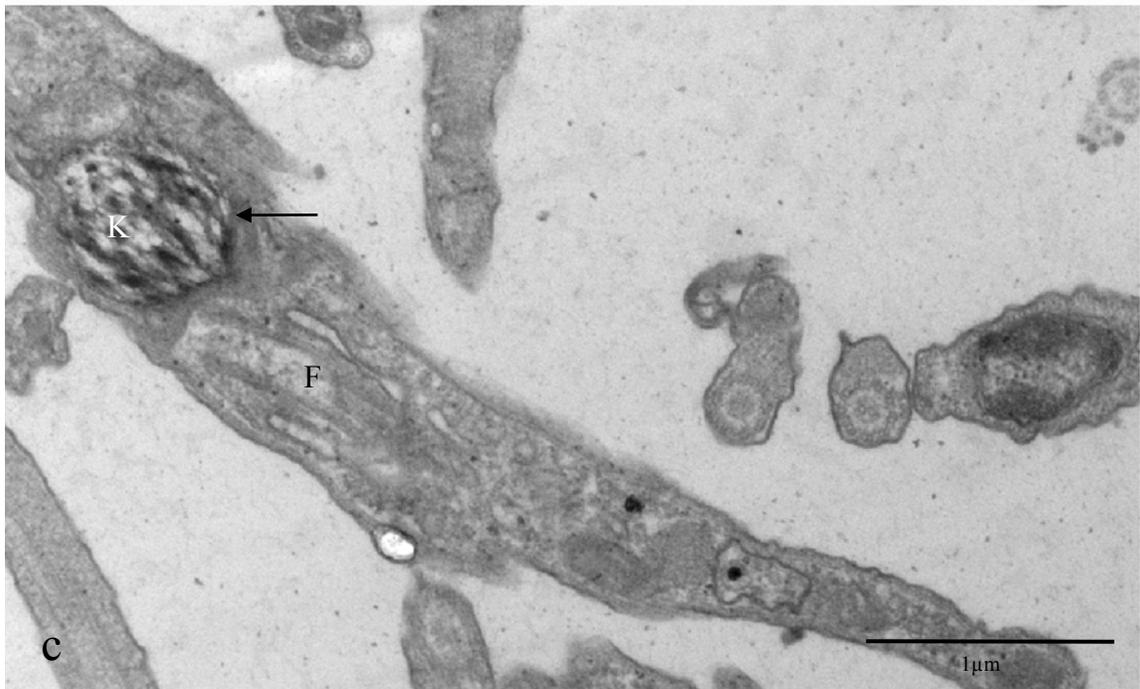
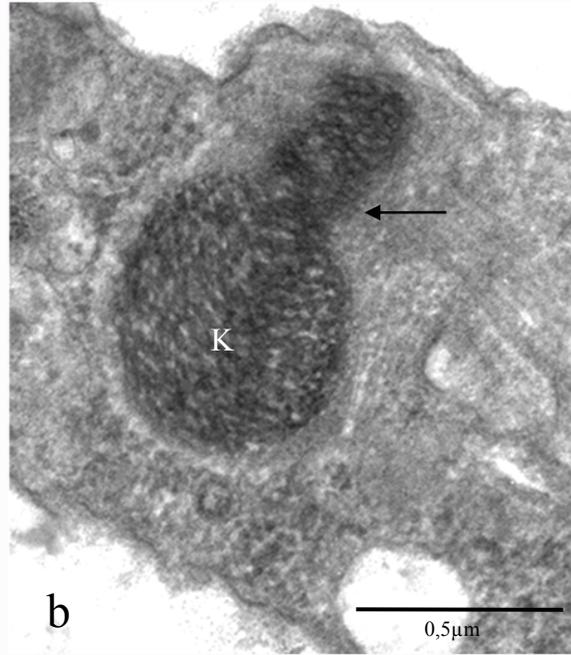
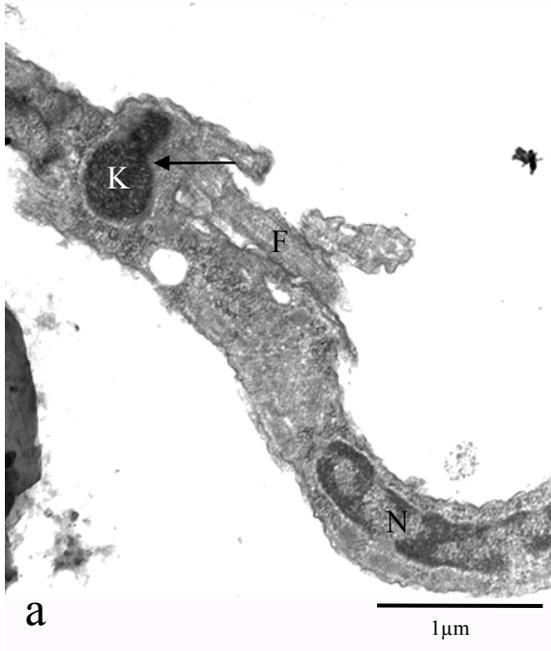


Figura 5: Ultra-estrutura de parasitas durante o processo de metaciclogênese “*in vitro*”.

a – Estágio final de diferenciação “*in vitro*” mostrando a localização posterior do cinetoplasto. Podemos observar que o cinetoplasto se encontra em um estágio final de transformação apresentando ainda uma porção com formato de bastão e o restante em forma arredondada característico de formas tripomastigotas (seta). **b** – Maior aumento da figura 5a. **c** – Forma tripomastigota no estágio final da diferenciação apresentando cinetoplasto em formato arredondado (seta). N - núcleo; K - cinetoplasto; R – reservossomo; F – flagelo.

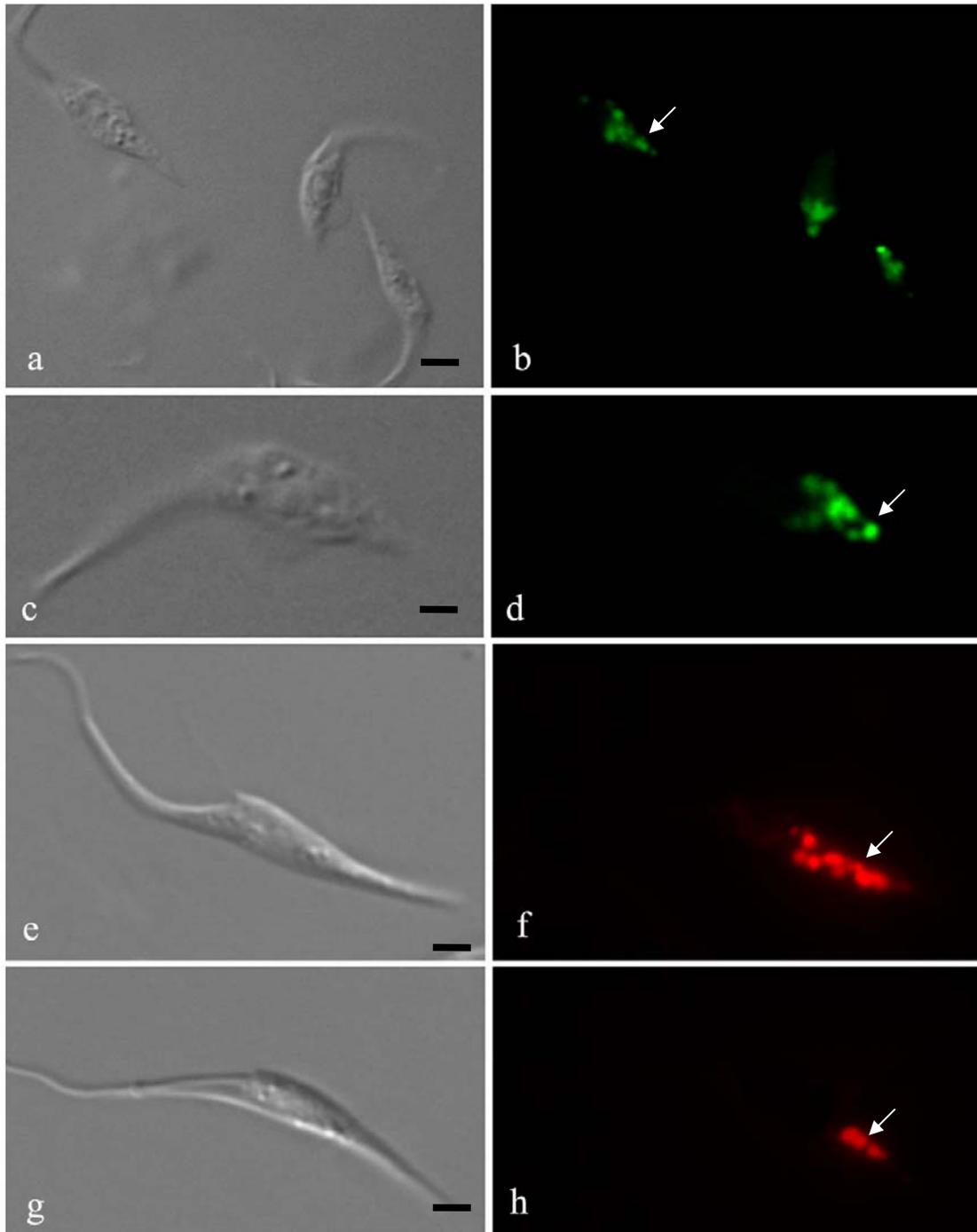


5.3- Destino dos traçadores endocíticos nos estágios de desenvolvimento obtidos durante a metaciclologênese “*in vitro*”

Com o intuito de analisar o destino do material endocitado e dos reservossomos durante o processo de metaciclologênese, formas epimastigotas obtidas de meio LIT B foram incubadas na presença de diferentes traçadores: Albumina bovina conjugada a Alexa-488, Transferrina conjugada a Alexa-546 e Microesferas de poliestireno fluorescentes de 100 nm por 30 minutos a 28°C. Após a detecção dos traçadores por toda a via endocítica as parasitas foram lavados para a retirada desses traçadores do meio extracelular e colocados novamente em LIT B por mais 30 minutos para que os traçadores se acumulassem exclusivamente nos reservossomos (Figura 6), posteriormente, os epimastigotas foram submetidos ao processo de diferenciação “*in vitro*”. Para garantir que as formas tripomastigotas se originaram de formas epimastigotas carregadas com os traçadores endocíticos a taxa de endocitose antes do processo de metaciclologênese foi quantificada através de contagem no microscópio de fluorescência. Para todos os traçadores utilizados encontramos que cerca de 80 % das formas epimastigotas apresentavam traçadores acumulados nos reservossomos (Figura 7).

Figura 6: Endocitose de albumina e transferrina em parasitos controle

a, c, e, g – Contraste diferencial interferencial (DIC) de formas epimastigotas. **b, d** – Epimastigotas mostrando o acúmulo de Albumina- Alexa 488nm nos reservossomos (seta). **f, h** – Epimastigotas mostrando o acúmulo de transferrina-alexa 546nm nos reservossomos (seta). Barras: 2 μ m.



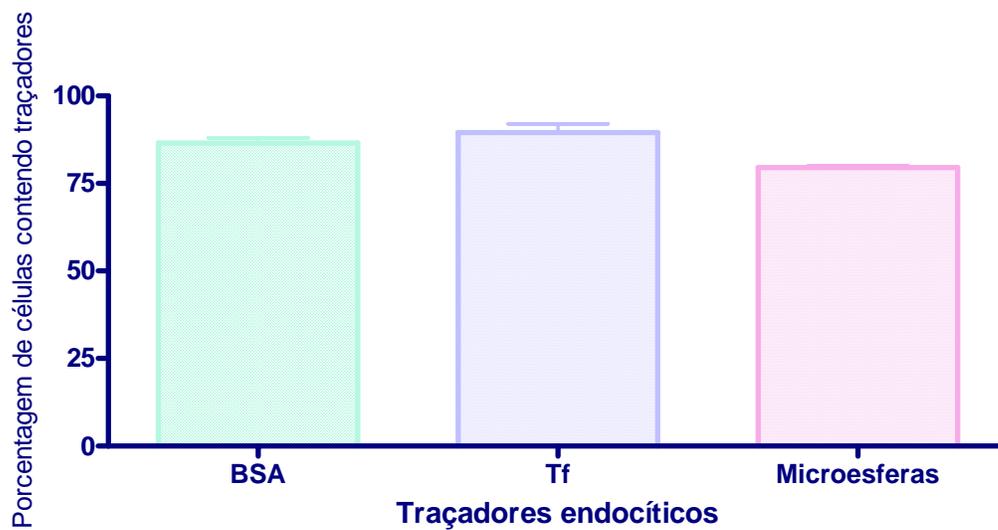


Figura 7: Análise quantitativa do processo endocítico em epimastigotas crescidos em meio LIT B

Epimastigotas foram incubados por 30 minutos a 28°C na presença dos marcadores da via endocítica: Albumina, transferrina e esferas de poliestireno. O histograma mostra que para todos os traçadores pelo menos 80% dos epimastigotas se encontram marcados. Experimentos foram realizados em triplicata e são representados como valor médio e desvio padrão.

Após o acúmulo dos traçadores nos reservossomos as formas epimastigotas foram submetidas ao processo de metacicloênese. Os tempos de diferenciação estabelecidos anteriormente foram analisados, onde parte desse material foi corado por Panótico para quantificação da taxa de diferenciação e outra parte foi observada com o intuito de localizar os traçadores nas formas epimastigotas remanescentes, em formas intermediárias e tripomastigotas totalmente diferenciados. Nestes experimentos observamos então o destino de cada traçador para inferir se o acúmulo destes traçadores nos reservossomos impediria a metacicloênese. Realizamos também experimentos de controle positivo da metacicloênese, onde não havia a etapa de endocitose. Estes resultados mostraram que estes parasitas estavam diferenciando normalmente, apresentando taxas de diferenciação de cerca de 60% no tempo de 96 horas, como mostrado no gráfico controle (Figura 2). Nos experimentos de metacicloênese, que serão mostrados mais adiante, onde os epimastigotas receberam os traçadores não houve alteração significativa nas taxas de diferenciação, permanecendo semelhantes aos controles. Estes resultados indicam que o fato de os reservossomos estarem carregados de material endocitado não impede que o parasita entre em processo de diferenciação.

Albumina conjugada a Alexa-488 nm: O acúmulo deste traçador também não inibiu as taxas de diferenciação. A taxa de diferenciação neste experimento chegou a uma porcentagem de aproximadamente 55% de formas tripomastigotas no tempo de 96 horas (Figura 8B), semelhante à taxa de aproximadamente 60% encontrada no tempo de 96 horas do experimento controle (Figura 8A). As formas intermediárias provenientes de todos os tempos de diferenciação observadas neste experimento apresentaram traçadores acumulados nos reservossomos e também em vesículas espalhadas pelo corpo (Figuras 9 c,

g, l). Dentre as formas tripomastigotas originadas após 96 horas de diferenciação, a porcentagem que não apresentava traçadores foi de 93 %, enquanto que somente 7 % destas formas permaneceram com o traçador acumulado (Figuras 10 g, l).

Transferrina conjugada a Alexa-546 nm: As taxas de diferenciação neste experimento também não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, chegando a aproximadamente 55% de formas tripomastigotas no final do processo (Figura 11b), semelhante à taxa de 60% de tripomastigotas no experimento controle (Figura 11a). A observação de parasitas, provenientes de todos os tempos de diferenciação, neste experimento mostrou que os traçadores permanecem acumulados nos reservossomos de formas intermediárias e também em vesículas espalhadas pelo corpo destes parasitas (Figura 12c,g). A observação de material endocitado acumulado em 10 % das formas tripomastigotas se mostrou bastante interessante visto que o acúmulo deste material fica confinado a região entre o núcleo e o cinetoplasto dos tripomastigotas (Figura 13g, l), corroborando dados recentes de nosso grupo que demonstram nesta mesma região a localização de organelas semelhantes a lisossomos. A porcentagem de formas tripomastigotas originadas neste processo que não apresentavam traçadores foi de 90%.

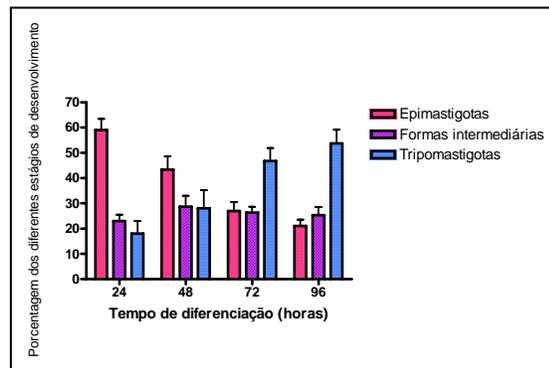
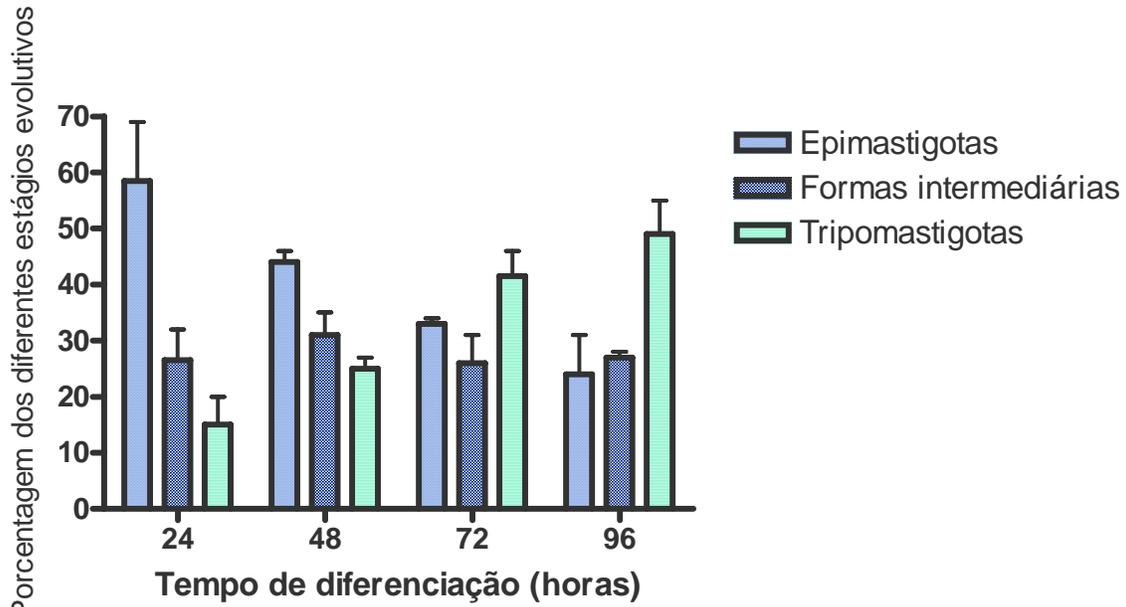


Figura 8: Porcentagem de estágios do desenvolvimento ao longo do processo de metaciclogênese associado à endocitose

Formas epimastigotas submetidas ao processo de metaciclogênese após endocitose de BSA-Alexa 488. Podemos observar uma taxa de diferenciação de cerca de 55% no tempo de 96 horas. O inset representa o experimento controle, isto é, sem endocitose, para comparação das taxas de diferenciação, reproduzindo a figura 2 apresentada anteriormente. Experimentos realizados em triplicata. A análise de variância foi determinada pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls, mostrando que as variações entre os valores de formas epimastigotas e tripomastigotas são significativas ($p < 0,05$), enquanto que nas formas intermediárias a diferença não é significativa ($p > 0,05$).

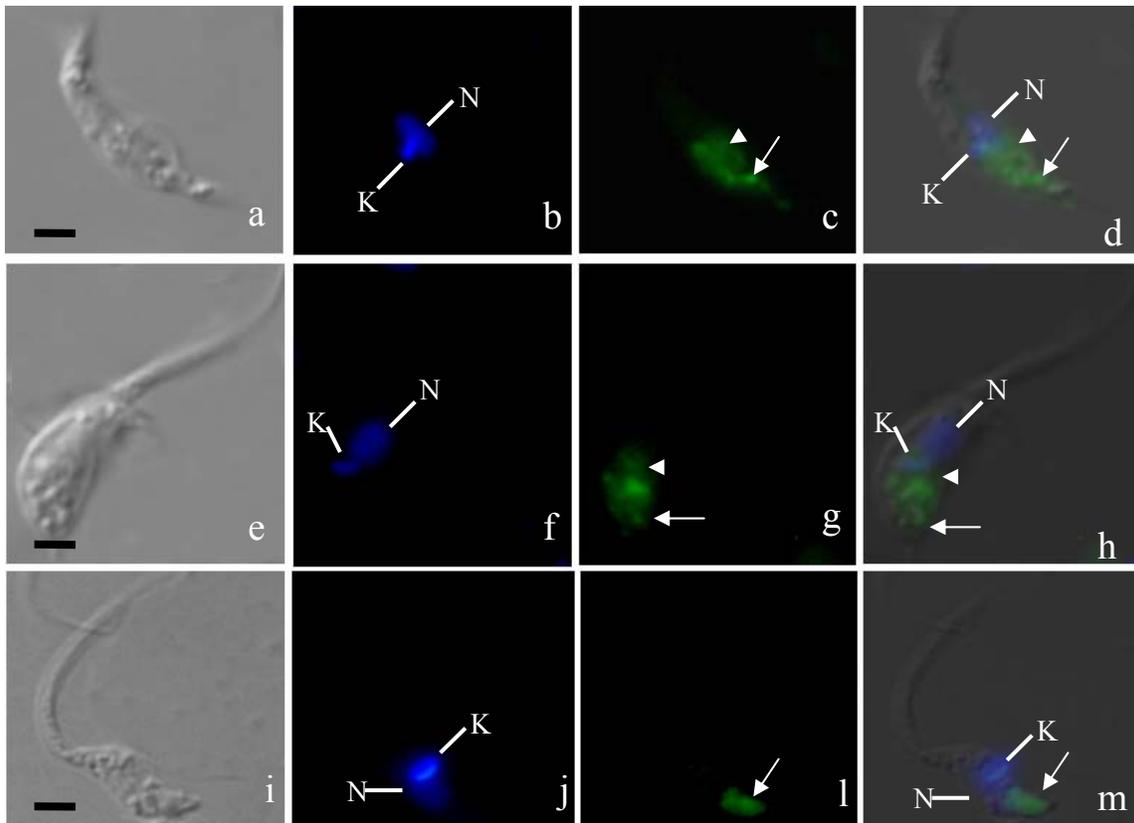


Figura 9: Localização de BSA-Alexa 488 em formas intermediárias após a metaciclogênese

a, e, i – DIC de formas intermediárias. **b, f, j** – Localização de núcleo e cinetoplasto com DAPI. **c, g, l** – Observamos que o traçador BSA-Alexa 488 permanece nos reservossomos de formas intermediárias (seta) e também em regiões mais próximas ao núcleo (cabeça de seta) após a metaciclogênese. **d** – Superposição das figuras 9a, 9b e 9c. **h** – Superposição das figuras 9e, 9f e 9g. **m** – Superposição das figuras 9i, 9j e 9l. N – núcleo, K – cinetoplasto. Barras: 2 μ m

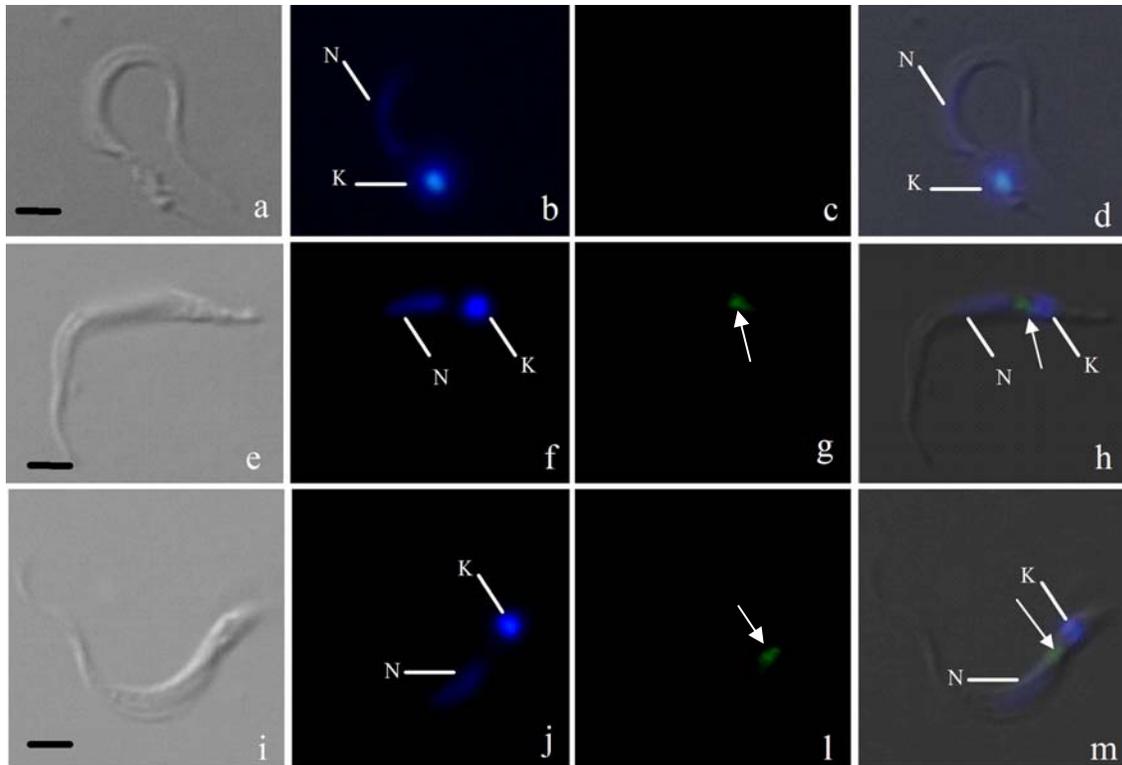


Figura 10: Localização de BSA-Alexa 488 em formas tripomastigotas após a metaciclogênese

a, e, i – DIC de formas tripomastigotas obtidas após o processo de metaciclogênese “*in vitro*”. **b, f, j** – Localização de núcleo e cinetoplasto com DAPI. **c, g, l** – Localização de BSA-Alexa 488 em formas tripomastigotas. Podemos observar que alguns parasitas não apresentam traçadores remanescentes (c) e que em outros observamos o acúmulo de traçadores remanescentes de epimastigotas (g,l). Com a superposição das imagens observamos que esses traçadores permanecem acumulados em formas tripomastigotas na região entre o núcleo e o cinetoplasto, indicando que esse acúmulo se dá em organelas relacionadas a lisossomos (seta). **d** – Superposição das figuras 10a, b, c. **h** – Superposição das figuras 10e, f, g. **m** – Superposição das figuras 10i, j, l. N – núcleo, K – cinetoplasto. Barras: 2µm

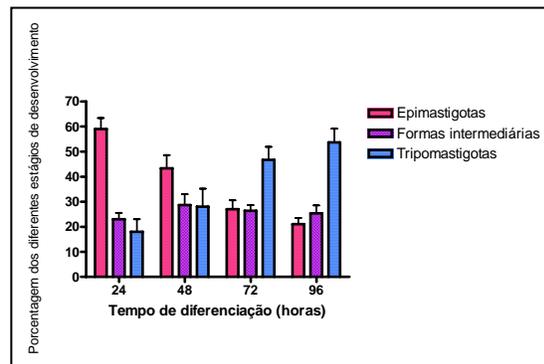
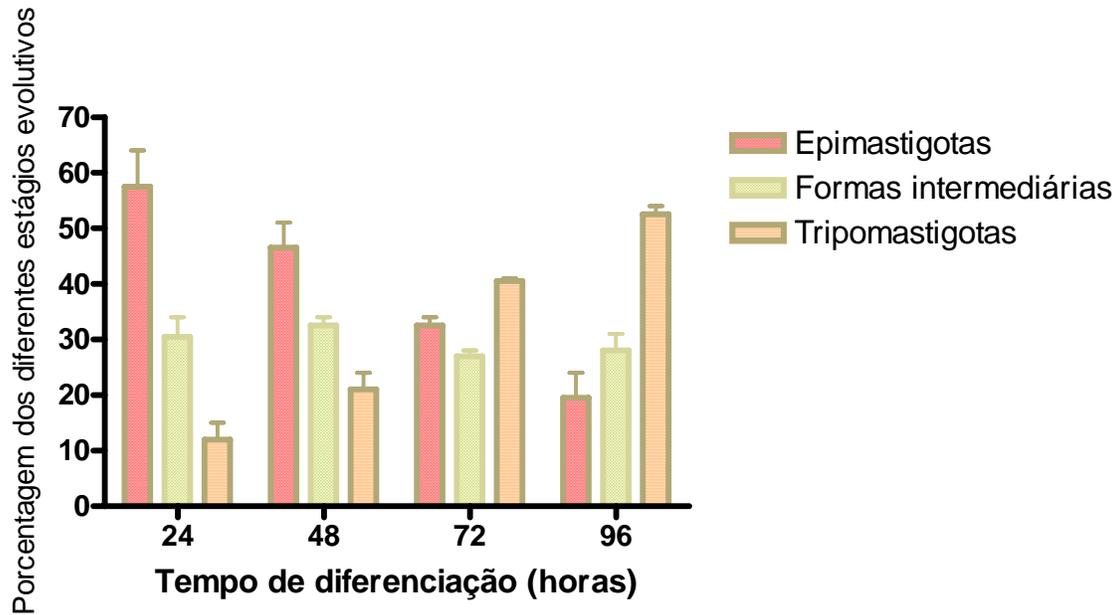


Figura 11: Porcentagem de estágios do desenvolvimento ao longo do processo de metaciclôgênese associado à endocitose

Formas epimastigotas submetidas ao processo de metaciclôgênese após endocitose de Tf-Alexa 546. Podemos observar uma taxa de diferenciação de cerca de 55% no tempo de 96 horas. O inset representa o experimento controle, isto é, sem endocitose, para comparação das taxas de diferenciação, reproduzindo a figura 2 apresentada anteriormente. Experimentos realizados em triplicata. A análise de variância foi determinada pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls, mostrando que as variações entre os valores de formas epimastigotas e tripomastigotas são significativas ($p < 0,05$), enquanto que nas formas intermediárias a diferença não é significativa ($p > 0,05$).

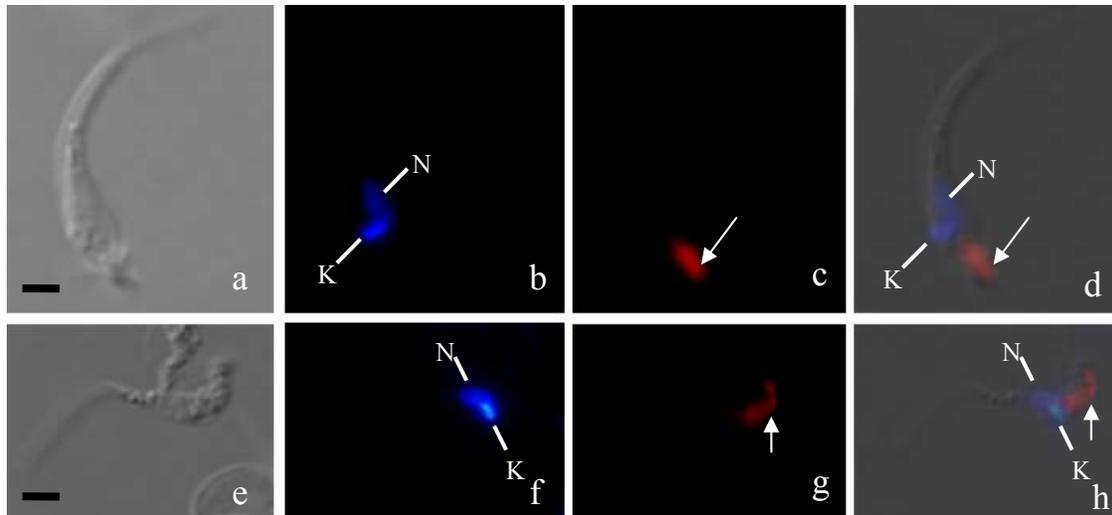


Figura 12: Localização de Tf-Alexa 546 em formas intermediárias após a metaciclogênese

a, e – DIC de formas intermediárias. **b, f** – Localização de núcleo e cinetoplasto com DAPI. **c, g** – Observamos que nas formas intermediárias, após a metaciclogênese, o traçador Tf-Alexa 546 permanece acumulado em regiões compatíveis com organelas relacionadas a lisossomos (seta). **d** – Superposição das figuras 12a, 12b e 12c. **h** – Superposição das figuras 12e, 12f e 12g. N – núcleo, K – cinetoplasto. Barras: 2 μ m.

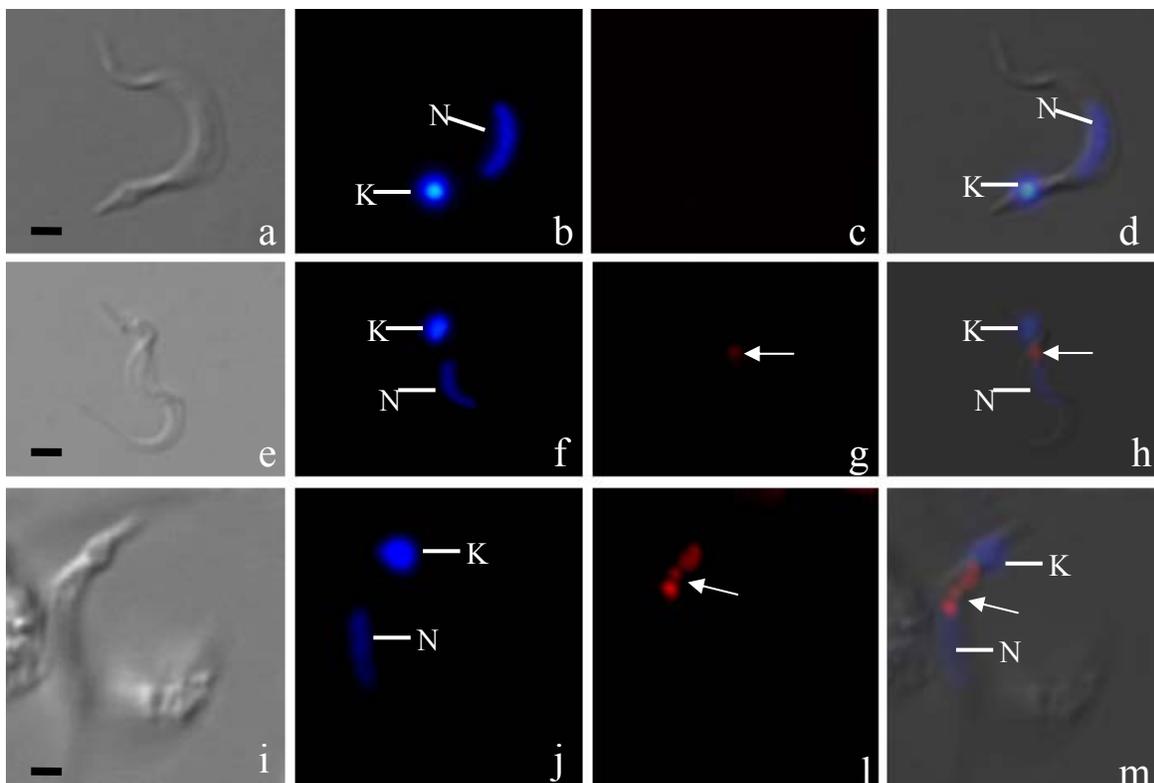


Figura 13: Localização de Tf-Alexa 546 em formas tripomastigotas após a metaciclogênese

a, e, i – DIC de formas tripomastigotas. **b, f, j** – Localização de núcleo e cinetoplasto com DAPI. **c, g, l** – Localização de Tf-Alexa 546 em formas tripomastigotas. Podemos observar que alguns parasitas não apresentam traçadores remanescentes (c) e que em outros observamos o acúmulo de traçadores remanescentes de epimastigotas (g,l). Com a superposição das imagens observamos que esses traçadores permanecem acumulados em formas tripomastigotas na região entre o núcleo e o cinetoplasto, indicando que esse acúmulo se dá em organelas relacionadas a lisossomos (seta). **d** – Superposição das figuras 13a, 13b e 13c. **h** – Superposição das figuras 13e, 13f e 13g. **m** – Superposição das figuras 13i, 13j e 13l. N – núcleo, K – cinetoplasto. Barras: 2 μ m.

Esferas de poliestireno: O acúmulo das microesferas de poliestireno de 100nm nos reservossomos não impediu que as formas epimastigotas entrassem em processo de diferenciação. A taxa de diferenciação encontrada neste experimento foi semelhante à taxa encontrada no experimento controle, isto é, sem endocitose, chegando a uma porcentagem de 60% de formas tripomastigotas no tempo de 96 horas de diferenciação (Figura 14b). A partir do material proveniente da metaciclologênese com endocitose desses traçadores, observamos que as microesferas permanecem acumuladas em formas intermediárias, apresentando algumas vezes partículas em regiões típicas de reservossomos, isto é, na região posterior, e em algumas vezes espalhadas por outras regiões do corpo do parasita (Figura 15 c, g). Um fato interessante que observamos nesses experimentos foi que 8,5 % das formas tripomastigotas ainda apresentavam traçadores remanescentes de formas epimastigotas, porém, 91,5 % dessas formas não continham nenhum traçador (Figura 16).

Os experimentos sobre a influência do acúmulo nos reservossomos de traçadores endocíticos no processo de diferenciação “*in vitro*” mostraram que qualquer que seja o traçador, digerível ou não, a porcentagem de formas tripomastigotas após 96 horas de diferenciação não variou significativamente em relação ao experimento controle. Este dado confirma que o fato dos reservossomos das formas epimastigotas estarem carregados de material endocitado não impede que o parasita entre em processo de diferenciação (Figura 17).

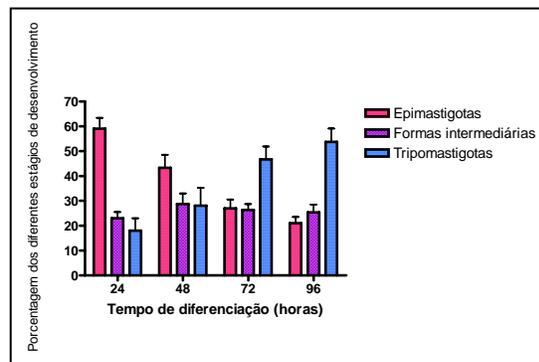
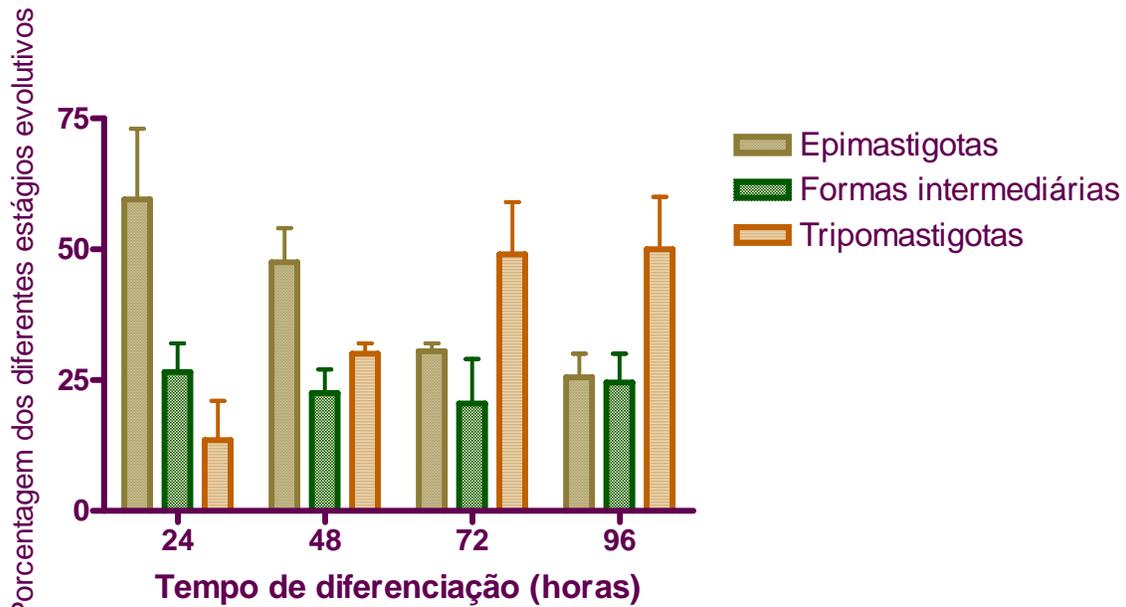


Figura 14: Porcentagem de estágios do desenvolvimento ao longo do processo de metaciclogênese associado a endocitose

Formas epimastigotas submetidas ao processo de metaciclogênese após endocitose de microesferas de poliestireno de 100nm. Podemos observar uma taxa de diferenciação de cerca de 60% no tempo de 96 horas. O inset representa o experimento controle, isto é, sem endocitose, para comparação das taxas de diferenciação, reproduzindo a figura 2 apresentada anteriormente. Experimentos realizados em triplicata. A análise de variância foi determinada pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls, mostrando que as variações entre os valores de formas epimastigotas e tripomastigotas são significativas ($p < 0,05$), enquanto que nas formas intermediárias a diferença não é significativa ($p > 0,05$).

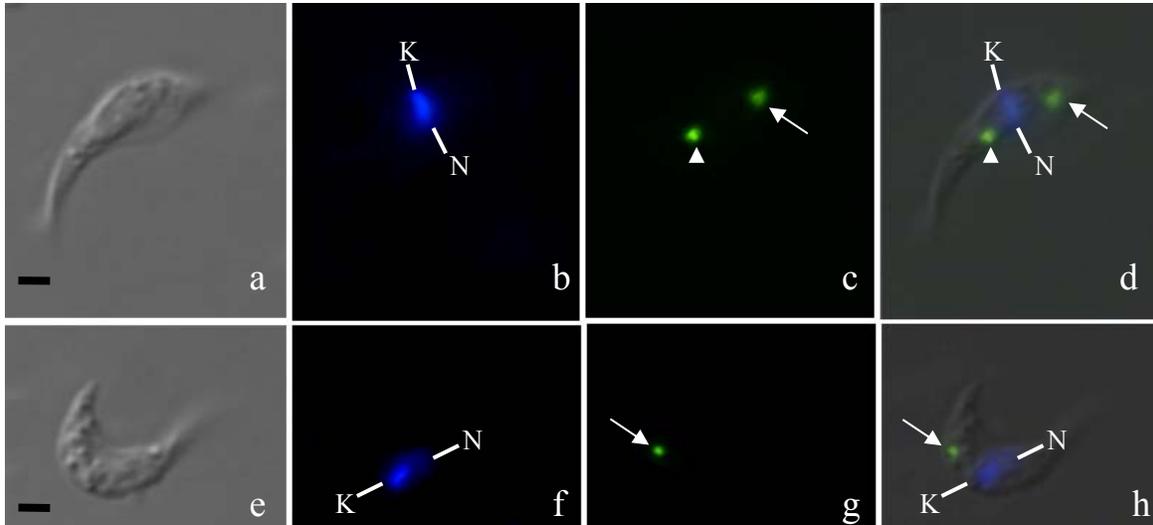


Figura 15: Localização de microesferas de poliestireno em formas intermediárias após a metaciclogênese

a, e – DIC de formas intermediárias. **b, f** – Localização de núcleo e cinetoplasto com DAPI. **c, g** – Podemos observar formas intermediárias apresentando traçador acumulado nos reservossomos (setas) e na região anterior (cabeça de seta). **d** – Superposição das figuras 15a, 15b e 15c. **h** – Superposição das figuras 15e, 15f e 15g. N- núcleo, K – cinetoplasto. Barras: 2 μ m.

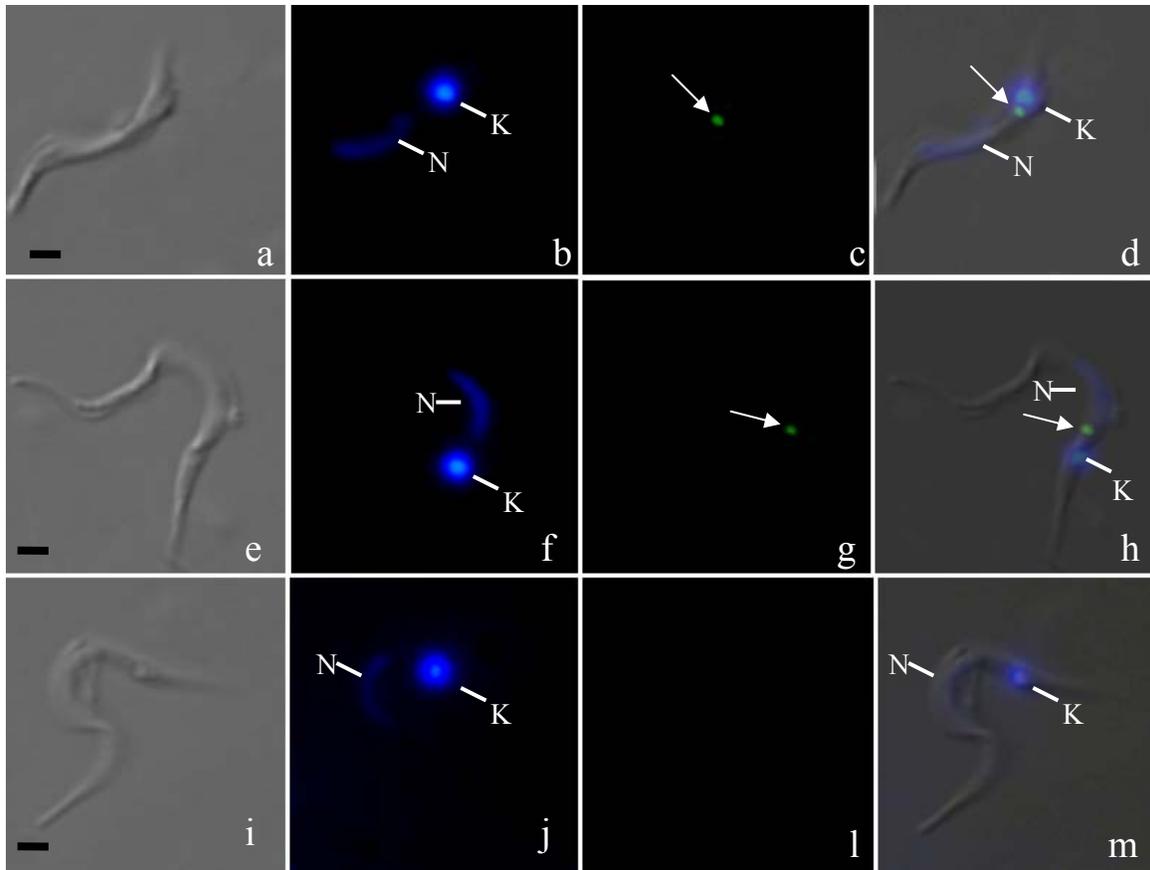


Figura 16: Localização de microesferas de poliestireno em formas tripomastigotas após a metaciclogênese

a, e, i – DIC de formas tripomastigotas. **b, f, j** – Localização de núcleo e cinetoplasto com DAPI. **c, g, l** – Localização de microesferas de poliestireno em formas tripomastigotas. Podemos observar que alguns parasitas não apresentam traçadores remanescentes (l) e que em outros observamos o acúmulo de traçadores remanescentes de epimastigotas (c,g). Com a superposição das imagens observamos que esses traçadores permanecem acumulados em formas tripomastigotas na região entre o núcleo e o cinetoplasto, indicando que esse acúmulo se dá em organelas relacionadas a lisossomos (seta). **d** – Superposição das figuras 16a, 16b e 16c. **h** – Superposição das figuras 16e, 16f e 16g. **m** – Superposição das figuras 16i, 16j e 16l. N – núcleo, K – cinetoplasto. Barras: 2 μ m.

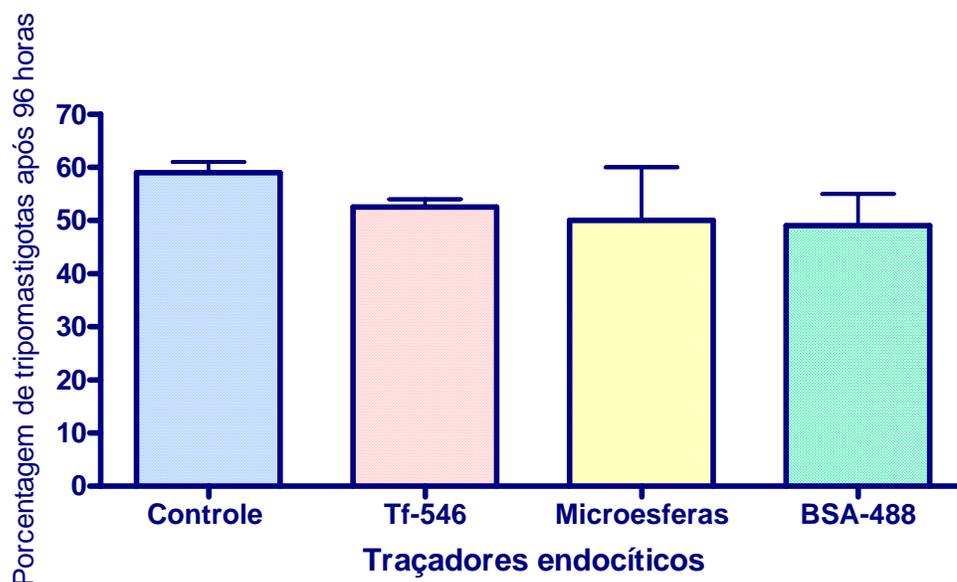


Figura 17: Porcentagem de formas tripomastigotas após 96 horas de diferenciação na presença e ausência de traçadores endocíticos

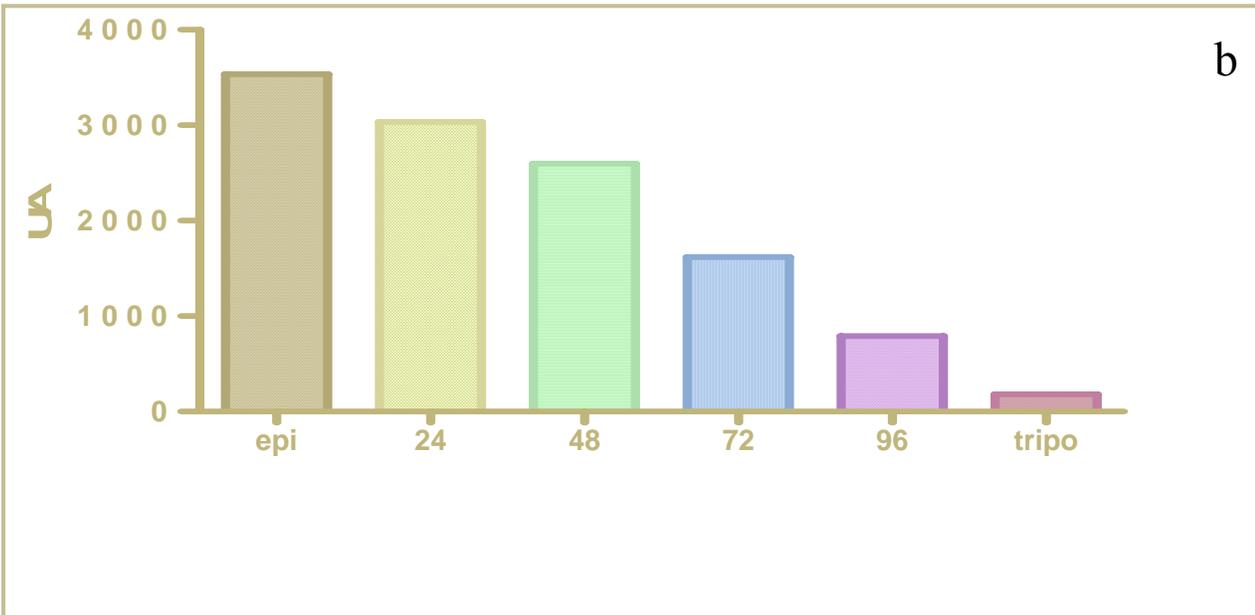
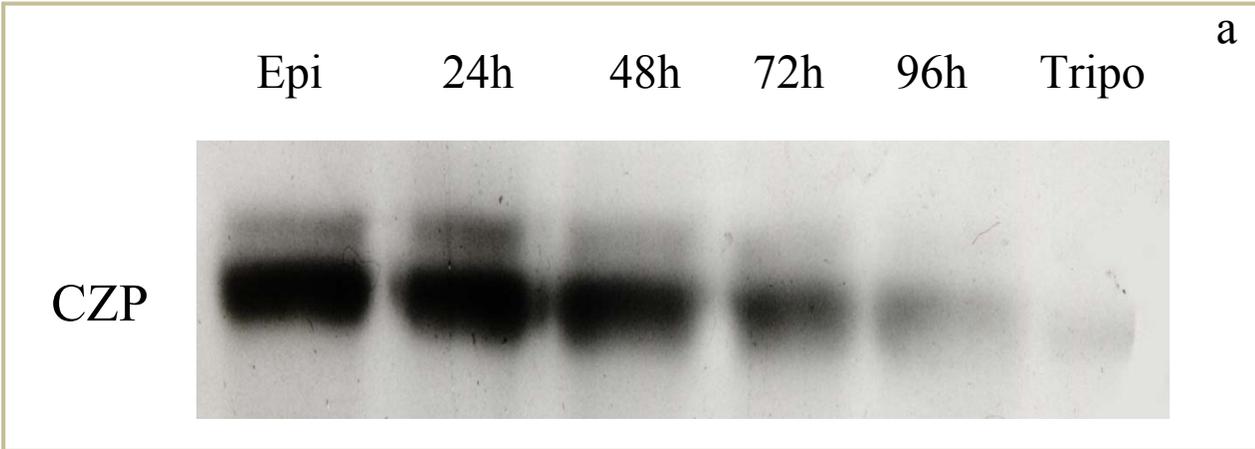
Quantificação de formas tripomastigotas no tempo de 96 horas de metaciclogênese sem a utilização de traçadores (controle) e com endocitose de diversos traçadores. Experimentos realizados em triplicata. A análise de variância foi determinada pelo teste de comparação múltipla Newman-Keuls, mostrando que as variações em relação ao controle não são significativas ($p > 0,05$).

5.4- Teor de cruzipáina e seu inibidor durante o processo de metaciclogênese

Com o objetivo de avaliar a expressão de cruzipáina, pró-cruzipáina e chagasina durante o processo de diferenciação, foram obtidos lisados dos parasitas de cada tempo de diferenciação estabelecido. A análise por Western blot foi realizada com anticorpos anti-cruzipáina, anti-pro cruzipáina e anti-chagasina. Com o anticorpo anti-cruzipáina (Figura 18a) observamos uma diminuição gradual da expressão dessa proteína na medida em que aumentava o número de formas tripomastigotas na amostra (Figura 18c). Este dado é confirmado pelos valores obtidos na densitometria (Figura 18b). Com o anticorpo anti-pró cruzipáina observamos uma diminuição gradual da expressão até o tempo de 48 horas de diferenciação, após este tempo a expressão apresenta níveis constantes. Nota-se também que na amostra que contém apenas formas tripomastigotas a expressão é praticamente ausente (Figura 19a). Este dado é confirmado pelos valores obtidos na densitometria (Figura 19b). Porém, com o anticorpo anti-chagasina (Figura 20a) observamos um aumento gradual da expressão dessa proteína ao longo do processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas (Figura 20c). Nota-se que a marcação mais forte se dá na amostra que só contém formas tripomastigotas. Este dado é confirmado pelos valores obtidos na densitometria (Figura 20b).

Figura 18: Teor de cruzipaina em parasitas durante o processo de metaciclogênese “in vitro”

A - A marcação com o anticorpo anti-CZP em parasitos durante o processo de metaciclogênese mostrou uma diminuição gradual da expressão desta proteína. Correlacionando com a contagem diferencial, observamos que a expressão diminui à medida que a porcentagem de formas tripomastigotas aumenta. **B** - Densitometria do western blot de CZP, comprovando que a expressão diminui ao longo do processo de diferenciação. **C** - Tabela mostrando a porcentagem de formas tripomastigotas e epimastigotas em cada tempo de diferenciação. Todas as amostras foram aplicadas no gel com a mesma quantidade de proteína (30µg). Tripo – tripomastigotas isoladas; Epi-epimastigotas.

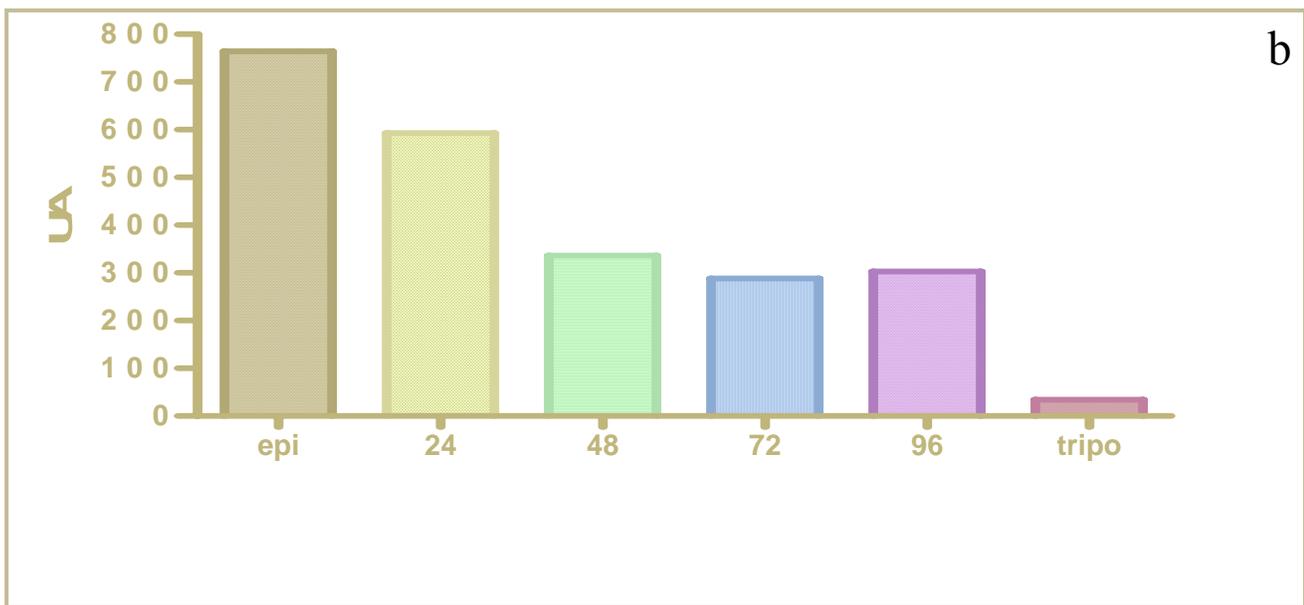
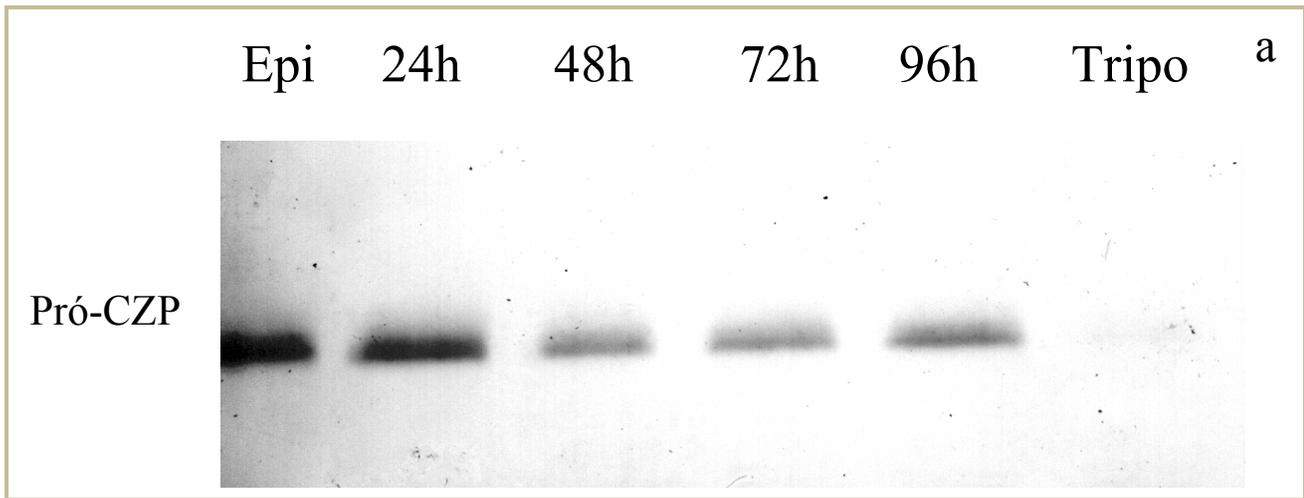


c

Epi	100%	57%	46%	20%	12%	0%
Tripo	0%	26%	28%	54%	67%	100%

Figura 19: Teor de pró-cruzipaína em parasitas durante o processo de metaciclologênese “*in vitro*”

A - A marcação com o anticorpo anti-pró-CZP em parasitas no processo de metaciclologênese mostrou uma diminuição gradual da expressão desta proteína até o tempo de 48 horas. Nos tempos de 72 e 96 horas a expressão se manteve constante. Já na amostra que só possui formas tripomastigotas a marcação é praticamente ausente. **B** - Densitometria do western blot de CZP, comprovando que a expressão diminui ao longo do processo de diferenciação. **C** - Tabela mostrando a porcentagem de formas tripomastigotas e epimastigotas em cada tempo de diferenciação. Todas as amostras foram aplicadas no gel com a mesma quantidade de proteína (30µg). Tripo -tripomastigotas isoladas; Epi-epimastigotas.

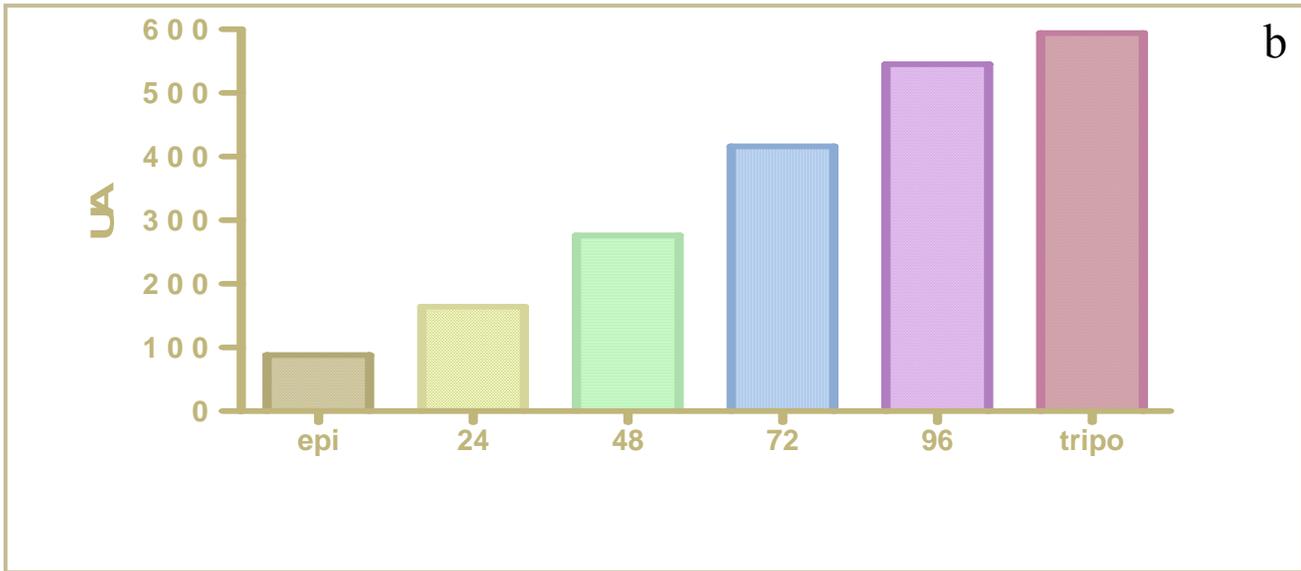
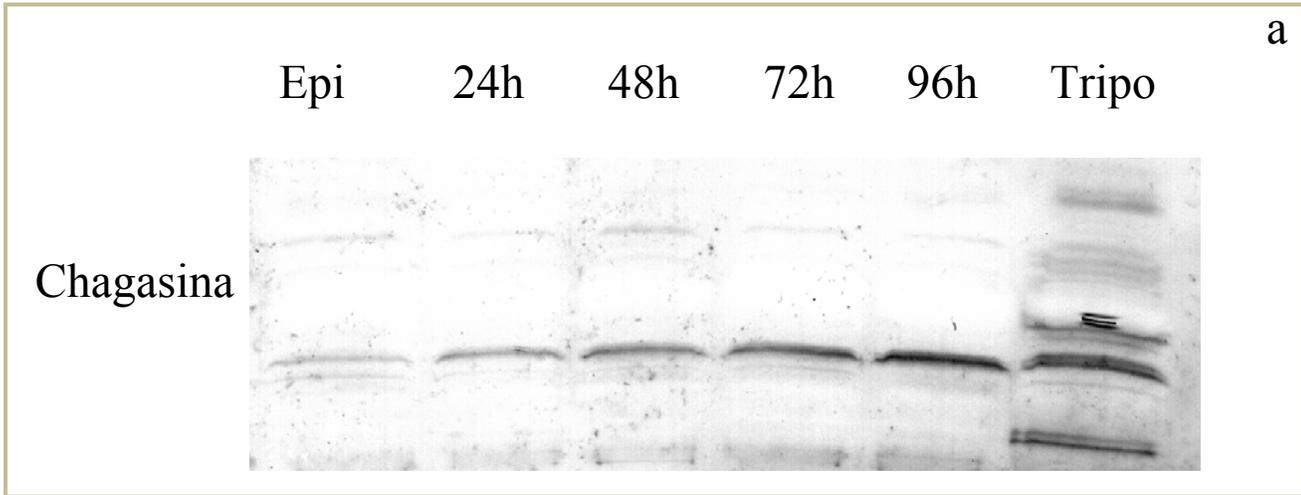


^c

Epi	100%	57%	46%	20%	12%	0%
Tripo	0%	26%	28%	54%	67%	100%

Figura 20: Teor de chagasina em parasitas durante o processo de metaciclogênese “*in vitro*”

A - A marcação com o anticorpo anti-chagasina mostrou que a expressão de chagasina aumenta concomitante com o aumento da porcentagem de formas tripomastigotas. **B** - Densitometria do western blot de Chagasina, comprovando que a expressão aumenta ao longo do processo de diferenciação. **C** - Tabela mostrando a porcentagem de formas tripomastigotas e epimastigotas em cada tempo de diferenciação. Todas as amostras foram aplicadas no gel com a mesma quantidade de proteína (100µg). Tripo-tripomastigotas isoladas; Epi-epimastigotas.



c

Epi	100%	57%	46%	20%	12%	0%
Tripo	0%	26%	28%	54%	67%	100%

5.5- Imunofluorescência

Com o objetivo de localizar a cruzipaina e a chagasina em parasitas durante o processo de diferenciação, principalmente em formas intermediárias, amostras de diversos tempos de metaciclogênese foram incubadas com anticorpos anti-cruzipaina e anti-chagasina. Em formas epimastigotas observamos a localização de cruzipaina (Figuras 21b, e, h) e de chagasina (Figuras 21c, f, i) nos reservossomos e, em alguns momentos, em regiões anteriores e algumas áreas de co-localização. Já nas formas tripomastigotas podemos observar marcação de cruzipaina (Figuras 21b, e, h) e chagasina (Figuras 21c, f, i) na região entre o núcleo e o cinetoplasto com áreas de co-localização. Em formas intermediárias podemos observar a localização majoritária de cruzipaina nos reservossomos (Figuras 22c, g, l). A chagasina apresenta uma maior concentração também nessas organelas, porém com alguma marcação em regiões mais anteriores, e algumas áreas de co-localização (Figuras 22d, h, m). Nota-se que alguns compartimentos positivos para chagasina são negativos para cruzipaina.

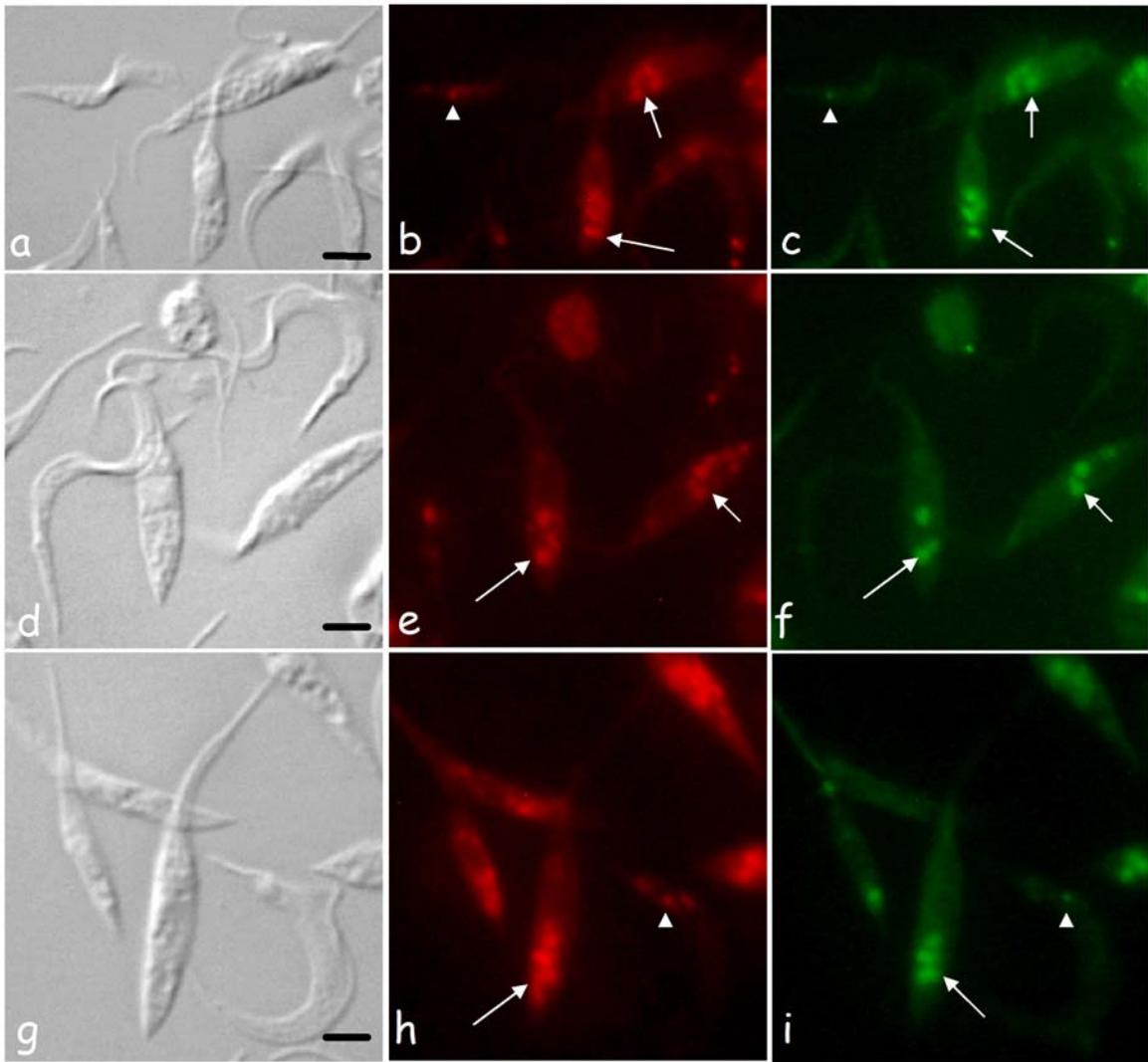


Figura 21: Imunolocalização de cruzipaina e chagasina em formas epimastigotas e tripomastigotas

a, d, g – DIC de formas epimastigotas e tripomastigotas. **b, e, h** - Imunolocalização de CZP mostrando o acúmulo dessa enzima nos reservossomos de formas epimastigotas (seta) e em algumas organelas na região anterior. Podemos observar marcação para CZP em regiões onde se localizam as organelas relacionadas a lisossomos em formas tripomastigotas (cabeça de seta). **c, f, i** - Imunolocalização de chagasina mostrando o acúmulo desse inibidor nos reservossomos de formas epimastigotas (seta). Podemos observar áreas de colocalização dessas proteínas nos reservossomos (setas) de formas epimastigotas e em regiões onde se localizam as organelas relacionadas a lisossomos em formas tripomastigotas (cabeça de seta). Barras: 2 μ m.

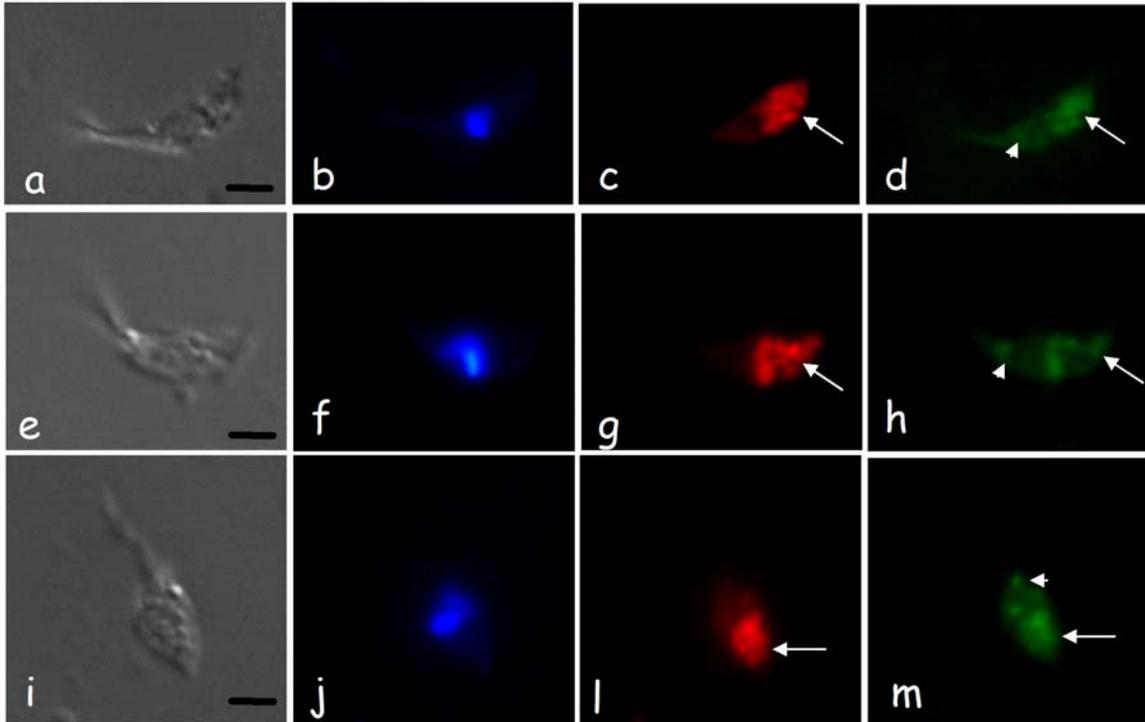
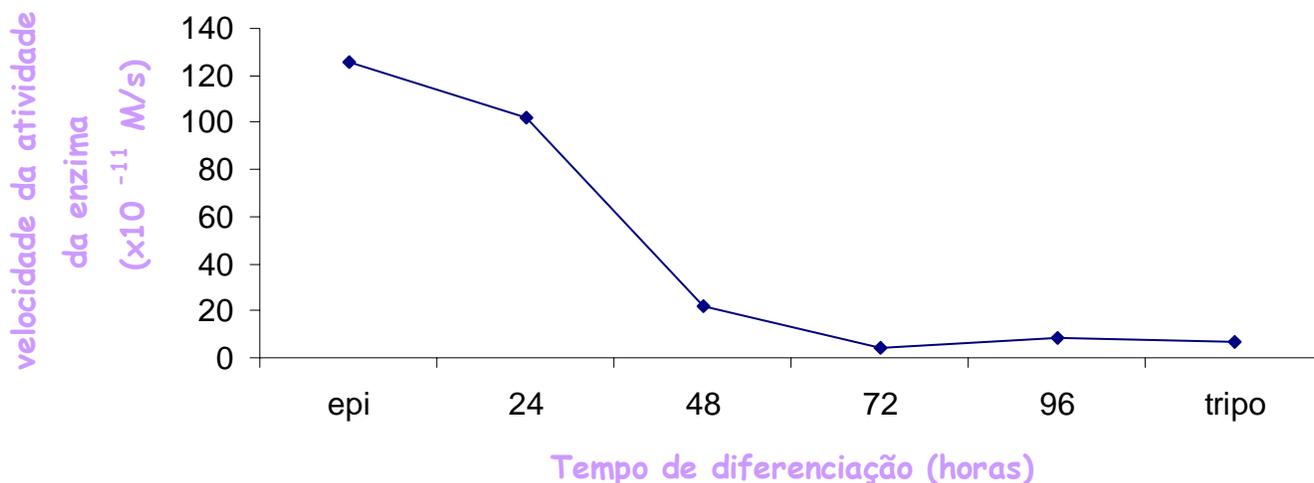


Figura 22: Imunolocalização de cruzipaina e chagasina em formas intermediárias formadas ao longo do processo de metacicloênese

a, e, i – DIC de formas intermediárias. **b, f, j** - Localização de núcleo e cinetoplasto com DAPI. **c, g, l** - Imunolocalização de CZP mostrando o acúmulo dessa enzima nos reservossomos (seta). **d, h, m** - Imunolocalização de chagasina mostrando o acúmulo desse inibidor nos reservossomos (seta) e em algumas organelas na região anterior (cabeça de seta). Podemos observar a colocalização na região posterior, provavelmente reservossomos (seta). Podemos notar que compartimentos positivos para chagasina na região anterior são negativos pra CZP (cabeça de seta). Barras: 2 μ m

5.6- Determinação enzimática da cruzipaina e da atividade inibitória da chagasina durante o processo de metacicloênese

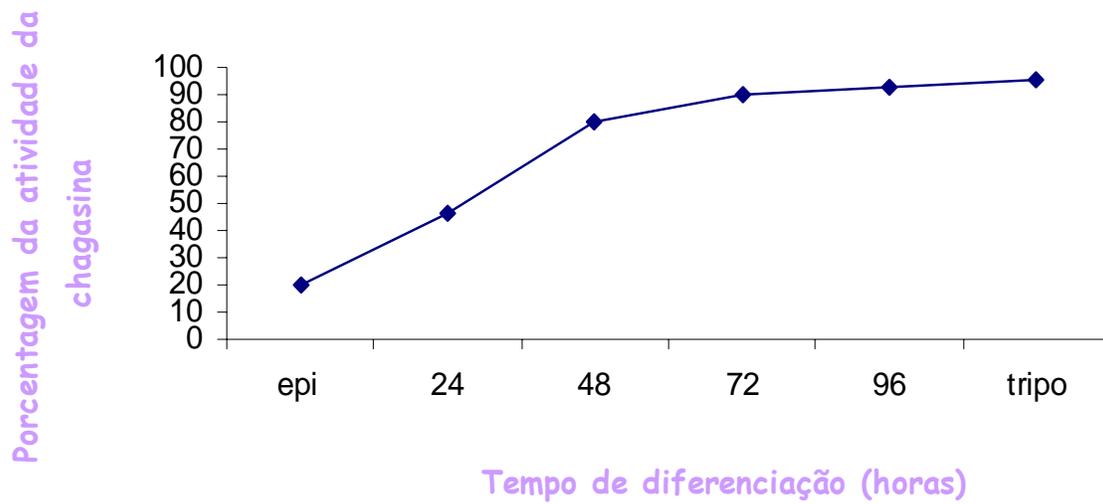
Os conteúdos de enzima funcional e seu inibidor nos lisados foram analisados através de ensaios enzimáticos utilizando substratos fluorogênicos. Através de nossos dados podemos observar a diminuição da atividade proteolítica da cruzipaina, que é consistente com a diminuição de formas epimastigotas na cultura ao longo da metacicloênese. A atividade da cruzipaina teve uma diminuição marcante no tempo de 48 horas, mantendo praticamente níveis constantes até o tempo de 96 horas e nas formas tripomastigotas (Figura 23). Os níveis de chagasina funcional também foram analisados, através da titulação dos lisados fervidos. A fervura se faz necessária para inativar as enzimas endógenas do lisado, desfazendo o complexo e preservando a chagasina funcionalmente ativa sob estado livre, uma vez que a chagasina é resistente a fervura (Monteriro *et al.*, 2001). O lisado fervido foi pré-incubado com papaína a uma concentração constante, seguido da adição do substrato para detecção da atividade residual da papaína. A partir daí foi realizado o cálculo da atividade inibitória da chagasina. Através desses dados podemos observar que a atividade inibitória da chagasina aumenta durante a metacicloênese. Observamos um grande aumento da atividade nas primeiras 48 horas de diferenciação, mantendo praticamente níveis constantes até o tempo de 96 horas e nas formas tripomastigotas (Figura 24).



Epi	100%	57%	46%	20%	12%	0%
Tripo	0%	26%	28%	54%	67%	100%

Figura 23: Dosagem enzimática da atividade da cruzipaína durante o processo de metacicloênese

Ensaio enzimáticos mostraram que a atividade da cruzipaína, assim como sua expressão, diminui a medida que aumenta o número de formas tripomastigotas nas amostras. Podemos observar uma grande redução da atividade no tempo de 48 horas, permanecendo praticamente constante até o tempo de 96 horas e em formas tripomastigotas. A tabela mostra as porcentagens de formas epimastigotas e tripomastigotas nos tempos de diferenciação.



Epi	100%	57%	46%	20%	12%	0%
Trip	0%	26%	28%	54%	67%	100%

Figura 24: Dosagem enzimática da atividade inibitória da chagasina durante o processo de metaciclogênese

Ensaio enzimáticos mostraram que a atividade inibitória da chagasina, assim como sua expressão, aumenta a medida que a diferenciação em formas tripomastigotas aumenta. Podemos observar um grande aumento da atividade inibitória no tempo de 48 horas, no mesmo tempo em que ocorre uma grande diminuição da atividade da CZP, permanecendo praticamente constante até o tempo de 96 horas e em formas tripomastigotas. A tabela mostra as porcentagens de formas epimastigotas e tripomastigotas nos tempos de diferenciação.

6- Discussão

6.1- Metaciclologênese *in vitro*

A reprodução *in vitro* do processo de metaciclologênese do *Trypanosoma cruzi* permitiu muitos avanços no entendimento do ciclo de vida deste parasito. Sabe-se que o processo de diferenciação de formas epimastigotas para formas tripomastigotas pode ser disparado por diversos fatores como a escassez de nutrientes (Camargo, 1964; Figueiredo *et al.*, 2000), variação de pH e alguns açúcares ou aminoácidos (Contreras *et al.*, 1985). Dados na literatura mostram que as taxas de diferenciação da metaciclologênese *in vivo* aparentam ser vetores-dependentes, variando de acordo com a espécie do vetor, alcançando a maior taxa de diferenciação (50%) com *Rhodnius neglectus* (Perlowagora-Szumlewicz e Moreira, 1994). No processo de diferenciação *in vitro* Contreras e colaboradores (1985) demonstraram que a taxa de formas tripomastigotas alcança valores de 80-90% após 96 horas de diferenciação. Nossos dados mostraram no modelo utilizado altas taxas de diferenciação, sendo de 25% de formas tripomastigotas no tempo de 24 horas e chegando a cerca de 60% no tempo de 96 horas (Figura 2). Esses dados mostram que com este protocolo de metaciclologênese *in vitro* obtivemos altas taxas de formas tripomastigotas. Podemos observar também que as taxas de formas intermediárias se mantêm praticamente constantes ao longo do processo de diferenciação, sugerindo que os parasitos não permanecem nesse estágio por muito tempo, sendo assim mais difícil captar parasitos neste momento de diferenciação.

6.2- Ultraestrutura de parasitas no processo de metaciclologênese

O processo de metaciclologênese envolve, entre outros fatores, alterações morfológicas no parasito, com reorganização de suas estruturas internas. Ainda não se tem muito conhecimento sobre o mecanismo e em que momento da diferenciação ocorre a

reorganização das organelas. Dados na literatura mostram que durante o processo de metacicloênese o conteúdo dos reservossomos é degradado e esta organela desaparece (Soares *et al.*, 1989). Nesse processo verifica-se primeiramente o desaparecimento das inclusões lipídicas e, posteriormente, a matriz protéica tornar-se menos densa, sugerindo a utilização do seu conteúdo na diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota (Soares *et al.*, 1989). Porém, dados recentes de nosso grupo mostraram a presença de uma organela relacionada a lisossomos (LRO) localizada na região entre o núcleo e o cinetoplasto de formas tripomastigotas. Essas organelas apresentavam marcação para enzimas que usualmente se localizam nos reservossomos de epimastigotas, como a cruzipaina e serino carboxipeptidase, e a marcação, em alguns compartimentos, de chagasina. Também se observou a presença de H⁺-ATPases do tipo P e um caráter ácido, semelhante aos reservossomos de epimastigotas, através da incubação com Lysotracker. No entanto, essas organelas não possuem acessibilidade a traçadores endocíticos, não podendo ser caracterizadas como reservossomos. Com todos esses dados surge a pergunta se realmente os reservossomos desaparecem completamente no processo de diferenciação ou se essas organelas se modificam, alterando tamanho, forma e distribuição ou se simplesmente perdem a capacidade de receber material endocítico, originando as organelas encontradas em tripomastigotas. Os dados obtidos neste trabalho não são suficientes para responder esta pergunta e ainda necessitamos de mais observações. Neste trabalho observamos que durante o processo de diferenciação as formas intermediárias mantêm características de formas epimastigotas e tripomastigotas. Nossos dados mostram que o citóstoma, estrutura típica de epimastigotas permanece em formas intermediárias em um processo avançado de diferenciação, onde o cinetoplasto se localiza posteriormente ao núcleo, sugerindo que esta estrutura seja perdida em um estágio tardio da diferenciação

(Figuras 3b, c). Nossos dados mostram um possível processo de fusão dos reservossomos com a membrana plasmática, sugerindo um processo de exocitose (Figura 3d).

Uma estrutura característica desses parasitos e que sofre grande alteração e reorganização durante a metacicloênese é o cinetoplasto. Esta estrutura muda da forma de bastão localizada na região anterior de formas epimastigotas para uma forma arredondada localizada na região posterior nas formas tripomastigotas (revisto por De Souza, 1999). Não existe nenhum dado na literatura atual que demonstre em que momento da metacicloênese durante a migração do cinetoplasto acontece a transformação de seu formato de bastão para o formato arredondado de formas tripomastigotas. Nossos dados sugerem que essa transformação ocorra posteriormente a sua migração para a região posterior nas formas tripomastigotas, uma vez que, observamos formas intermediárias onde o cinetoplasto ainda possui formato de bastão e já se localiza em uma região posterior ao núcleo (Figuras 4a, b, c, d) e só começamos a observar a transformação do cineplasto para a forma arredondada quando ele se encontra na região posterior da célula (Figuras 4e, f). Também observamos parasitos com formato de formas tripomastigotas e que ainda não terminaram completamente a transformação do cinetoplasto (Figuras 5a-c).

6.3- Destino dos traçadores endocíticos nos estágios de desenvolvimento obtidos durante a metacicloênese “*in vitro*”

Dados da literatura mostram que alguns fatores bloqueiam e impedem a metacicloênese, entre eles podemos citar o tratamento com inibidores da cruzipaina (Meirelles *et al.*, 1992) e o enriquecimento do meio de diferenciação. Figueiredo e colaboradores (2000) realizaram experimentos mostrando que a adição de transferrina ao meio de diferenciação TAU3AAG inibe a metacicloênese e promove a proliferação de

formas epimastigotas, ao contrário do experimento controle onde não foi adicionado transferrina e os epimastigotas continuaram normalmente seu processo de diferenciação alcançando altas taxas de formas tripomastigotas. Com o intuito de verificar a influência da endocitose e do acúmulo dos traçadores no processo de metaciclogênese realizamos experimentos onde o traçador endocítico é fornecido previamente as formas epimastigotas. Após o acúmulo nos reservossomos, os traçadores são retirados do meio e então as células são colocadas no meio de diferenciação. Nossos dados sugerem que o acúmulo nos reservossomos dos traçadores testados não impede que as formas epimastigotas se diferenciem em formas tripomastigotas. A quantificação das taxas de diferenciação da metaciclogênese associada a endocitose com os traçadores utilizados apresentaram valores semelhantes aos dados controle. Taxas de diferenciação obtidas com endocitose de BSA conjugada a Alexa 488 alcançaram valores de cerca de 60% de formas tripomastigotas no tempo de 96 horas (Figura 8b). Com endocitose de Tf conjugada a Alexa 546 os valores de tripomastigotas no tempo de 96 horas alcançaram cerca de 55% (Figura 11b). Com as microesferas os valores obtidos foram de cerca de 60% de tripomastigotas no tempo de 96 horas (Figura 14). Todos esses dados com vários traçadores mostram que o acúmulo de traçadores nos reservossomos, independente deste traçador ser digerível ou não, não impede a metaciclogênese.

A observação do material proveniente da metaciclogênese com endocitose de albumina ou transferrina conjugados a moléculas fluorescentes, mostrou que essas partículas permanecem acumuladas nas formas intermediárias em organelas semelhantes a lisossomos, apresentando também, algumas vezes partículas acumuladas em regiões espalhadas pelo corpo do parasita (Figuras 9 e 12 respectivamente). A localização dessas vesículas carregadas de material endocitado por todo o corpo do parasita sugere que essas

vesículas possam estar sofrendo um rearranjo ou que possam estar sendo destinadas para um futuro processo exocítico. Uma grande porcentagem de formas tripomastigotas e algumas formas intermediárias não apresentavam nenhum traçador remanescente, o que sugere que esses traçadores possam estar sendo eliminados durante o processo de diferenciação por secreção ou degradação. Existe ainda a possibilidade de que esses parasitos que não apresentam nenhum traçador remanescente sejam provenientes de formas epimastigotas que não endocitaram, porém a quantificação da endocitose mostrou que somente 15% dos parasitos não endocitaram os traçadores utilizados, o que se mostra um número muito inferior em comparação à porcentagem de formas tripomastigotas obtidas ao final de 96 horas que é de aproximadamente 70%. Com isso, descarta-se a possibilidade de que todos os tripomastigotas formados teriam se originados de epimastigotas que não haviam endocitado. Vale a pena ressaltar que neste protocolo de diferenciação as formas epimastigotas não multiplicam.

Os traçadores albumina e transferrina também foram encontrados em raras formas tripomastigotas (10% e 7%, respectivamente) (Figuras 10 e 13 respectivamente), que apresentavam forma do corpo e localização do núcleo e cinetoplasto característicos, o que sugere a possibilidade dessas formas ainda se encontrarem em um estágio bem terminal da diferenciação, porém não completo, possuindo ainda reservossomos remanescentes. O fato de que o acúmulo desses traçadores em formas tripomastigotas se dá sempre na região entre o núcleo e o cinetoplasto nos leva a discutir que talvez esses traçadores estejam acumulados em organelas semelhantes a lisossomos de formas epimastigotas, corroborando dados recentes de nosso grupo (Sant'Anna, Tese doutorado, IBCCF). Sugerimos que uma parte da população de formas tripomastigotas simplesmente mantenha o material endocitado por formas epimastigotas.

Para afastar o fato de que a degradação do material endocitado por formas epimastigotas seja essencial para a diferenciação realizamos experimentos de endocitose de esferas de poliestireno seguido de metacicloênese. Essas esferas não são digeridas pelos parasitos, portanto uma vez endocitadas pelos epimastigotas que irão sofrer processo de diferenciação, essas partículas ou permanecem acumuladas nas formas intermediárias e tripomastigotas ou são excretadas. Nestes experimentos observamos que a taxa de diferenciação de parasitas que endocitaram as microesferas foi semelhante a taxa de diferenciação do experimento controle, comprovando que a degradação total do material endocitado e acumulado nos reservossomos não é essencial para a metacicloênese. Nestes experimentos observamos que as formas intermediárias mantêm essas partículas em organelas semelhantes a lisossomos e em regiões espalhadas pelo corpo do parasito (Figuras 15c,g). Também observamos que 8,5% das formas tripomastigotas ainda apresentavam as esferas de látex acumuladas (Figuras 16c,g). Esses dados nos levam a sugerir que parte desse material permanece realmente acumulado em parte da população de formas tripomastigotas e que outra parte da população excrete esse material após ou durante a diferenciação. O fato de encontrarmos microesferas acumuladas em formas tripomastigotas também pode indicar que os parasitos que ainda possuem material acumulado ainda não tenham terminado totalmente seu processo de diferenciação, não descartando a hipótese de que esses parasitas ainda iriam excretar as microesferas.

Todos esses experimentos mostram que as variações nos valores do número de tripomastigotas obtidos em cada experimento com endocitose não são significativos ($p > 0,05$) em relação ao controle (Figura 17). Este gráfico confirma o fato de que a metacicloênese ocorre normalmente mesmo que as formas epimastigotas estejam carregadas de material endocitado. Com o protocolo utilizado em todos esses experimentos,

onde os traçadores endocíticos foram acumulados exclusivamente nos reservossomos, o que difere do protocolo utilizado por Figueiredo e colaboradores (2000), mostramos que a degradação de todo o conteúdo dos reservossomos não é essencial para o processo de diferenciação. Além disso, com o carregamento dos reservossomos antes do processo de diferenciação podemos acompanhar o destino do seu conteúdo em formas tripomastigotas, assim como analisar em que compartimentos esse material se acumula nessas formas. Acreditamos que esse protocolo seja uma importante ferramenta para o entendimento do destino dos reservossomos e de seu conteúdo durante a metaciclogênese. Contudo, neste trabalho faltam as análises dos dados de endocitose associado a metaciclogênese por microscopia eletrônica de transmissão, o que nos forneceria dados mais completos sobre possíveis eventos de exocitose dos traçadores acumulados e sobre os compartimentos em que esses traçadores se acumulam em formas tripomastigotas.

6.4- Expressão, atividade e localização da cruzipaina e seu inibidor durante o processo de metaciclogênese

Sabe-se que as cisteíno-proteases da família da papaína são encontradas na maioria dos organismos e estão associadas a inúmeros processos fisiológicos e patológicos (Bromme e Kaleta, 2002; Sajid e McKerrow, 2002). Em protozoários parasitas como *T. cruzi*, *T. brucei*, espécies de *Leishmania* e *P. falciparum*, essas enzimas atuam em processos biológicos como ativação enzimática, virulência, invasão celular e tissular, e desempenham funções essenciais para o ciclo de vida e/ou patogênese no hospedeiro mamífero (Selzer *et al.*, 1999; Sajid & McKerrow, 2002). Inibidores endógenos de alta afinidade de cisteíno-proteases, reguladores da atividade intracelular de proteinases lisossomais foram identificados em plantas e mamíferos. A presença de inibidores protéicos em protozoários vem sendo determinada e, estudos com espécies de *Leishmania*,

Plasmodium e *Entamoeba* têm demonstrado que estes parasitos podem utilizar mecanismos semelhantes.

Dados na literatura demonstram que a expressão de cruzipaína é regulada de acordo com o estágio evolutivo e que a expressão de cruzipaína é dez vezes maior nas formas epimastigotas que nas tripomastigotas (Campella *et al.*, 1990). A chagasina é expressa em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*, sendo mais abundante na forma tripomastigota do que nas formas amastigotas e epimastigotas (Monteiro *et al.*, 2001). Um trabalho prévio demonstrou que a super-expressão da cruzipaína aumenta a taxa de metaciclogênese (Tomas *et al.*, 1997).

A partir desses dados, resolvemos estudar neste trabalho a expressão, atividade e localização da cruzipaína e de seu inibidor durante o processo de metaciclogênese. Análises por western blot mostraram a diminuição da expressão de CZP durante o processo de metaciclogênese (Figura 18a), esses dados foram confirmados através de análise por densitometria (Figura 18b). Podemos observar uma diminuição significativa nos níveis de cruzipaína no tempo de diferenciação de 72 horas para 96 horas. Também observamos que a expressão de chagasina aumenta ao longo do processo de diferenciação (Figura 20a), porém no tempo de 72 horas para 96 horas observamos um aumento discreto nos níveis de chagasina, o que corrobora dados na literatura que mostram que elevações sutis nos níveis de expressão da chagasina levam a uma drástica redução da quantidade de cruzipaína ativa (Santos *et al.*, 2005). Neste intervalo também se observa um aumento drástico da porcentagem de formas tripomastigotas, que passam de 28% no tempo de 48 horas para 54% no tempo de 72 horas. Interessante observar que o western blot para CZP mostra a expressão da enzima total, ou seja, a enzima madura e a enzima não madura. Esses dados sugerem que a marcação encontrada nas formas tripomastigotas no western para CZP

mostra principalmente a enzima ativa, indicando que mesmo níveis baixos dessa enzima são suficientes para o processo de invasão dessas formas em células de mamífero. No western blot para pró-CZP (Figura 19a) observamos a expressão apenas da enzima não madura, mostrando que ela diminui ao longo da metaciclogênese até o tempo de 72 horas, onde se estabiliza, sendo praticamente ausente nas formas tripomastigotas. Esse fato pode estar baseado em dados da literatura que mostram que o aumento da expressão de chagasina interfere no tráfego celular e na maturação da pró-cruzipaína, provocando o aumento da secreção dessa proteína para o meio extracelular (Santos *et al.*, 2005). Como nos tempos de 72 e 96 horas as formas tripomastigotas são majoritárias, e essas formas possuem uma expressão alta de chagasina, provavelmente essa diminuição de pró-CZP seja causada pelo aumento da chagasina.

A cruzipaína é sintetizada como uma proteína precursora, uma pré-pró-enzima, com um peptídeo sinal hidrofóbico, um domínio central catalítico, uma região C-terminal e um prodomínio. O tráfego da cruzipaína do complexo de Golgi para os reservossomos foi descrito previamente por alguns autores (Soares *et al.*, 1992; Engel *et al.*, 1998a, b). Devido ao fato de que os receptores de manose 6-fosfato são ausentes no *T. cruzi* (Cazzulo *et al.*, 1990; Soares *et al.*, 1992), o endereçamento desta enzima para os reservossomos parece envolver mecanismos distintos daqueles conhecidos para enzimas destinadas aos lisossomos, em células de mamíferos. Esta característica sugere uma rota alternativa, que levaria a cruzipaína recém sintetizada para a superfície celular e desta para os compartimentos endocíticos, finalizando com a acumulação nos reservossomos. Dados prévios de nosso grupo mostraram, através de experimentos que promovem o reverso da metaciclogênese, que epimastigotas recém diferenciados, em que a expressão de cruzipaína está aumentando para atingir os níveis normalmente encontrados em epimastigotas

controle, não se encontra cruzipaina na bolsa flagelar nem em qualquer outro domínio da superfície, reforçando a idéia de uma rota direta de transporte da enzima do complexo de Golgi para os reservossomos (Sant'Anna *et al.*, 2004). Estudos ultraestruturais revelaram que a chagasina e a cruzipaina co-localizam no complexo de Golgi e nos reservossomos nas formas epimastigotas. Ao mesmo tempo, foi observado que a chagasina era capaz de formar complexos estáveis de alta afinidade “in vivo” com a cruzipaina na forma epimastigota, visualizadas pela lise das células utilizando tampão contendo β -mercaptoetanol e SDS, que são capazes de lisar a célula, mas mantêm o complexo enzima: inibidor estável (Santos *et al.*, 2005). Nossos dados de localização da CZP e chagasina durante o processo de metaciclogênese mostraram a co-localização de CZP e chagasina nos reservossomos de formas epimastigotas (Figura 21), corroborando dados da literatura (Santos *et al.*, 2005). Já nas formas tripomastigotas encontramos vesículas que co-localizam CZP e chagasina e outras que não apresentam marcação pra chagasina (Figura 21). Nas formas intermediárias encontramos colocação dessas proteínas nos reservossomos, porém encontramos algumas regiões onde só há marcação para chagasina (Figura 22). Vale ressaltar que os dados de imunofluorescência não são quantitativos, portanto não podemos fazer nenhuma correlação entre o fato de haver mais vesículas marcadas para CZP do que para chagasina com a quantidade de expressão dessas proteínas. A chagasina é expressa em maior quantidade do que a CZP em tripomastigotas e o fato de aparecerem menos vesículas marcadas para chagasina pode ser explicada pelo fato de que a chagasina também está presente na membrana plasmática de formas tripomastigotas, não sendo detectada pelo método de imunofluorescência, porém aparecendo no lisado total dos parasitos no western blot.

Dados da dosagem enzimática mostram uma diminuição da atividade de CZP (Figura 23) concomitante com um aumento da atividade inibitória de chagasina (Figura 24), esses dados corroboram dados do western blot, mostrando que essas proteínas estão ativas durante todo o processo de metaciclogênese, e que a medida que aumentam as formas tripomastigotas, aumenta a expressão de chagasina que pode regular a atividade da cruzipaina.

7- Conclusões

- Resultados ultra-estruturais sugerem que a transformação do cinetoplasto ocorra posteriormente sua migração para a região posterior em formas tripomastigotas, e que formas intermediárias bastante avançadas no processo de diferenciação ainda mantêm o citóstoma, estrutura típica de formas epimastigotas;
- O acúmulo de material endocitado nos reservossomos de formas epimastigotas não impede que esses parasitas entrem em processo de diferenciação;
- O material endocitado por formas epimastigotas permanecem acumulado nas formas intermediárias em organelas com mesma aparência e localização dos reservossomos;
- O material endocitado por formas epimastigotas permanecem acumulado em uma pequena porcentagem de formas tripomastigotas, no entanto, quando esse acúmulo acontece os traçadores ficam confinados em organelas localizadas entre o núcleo e o cinetoplasto, que se assemelham às organelas relacionadas a lisossomos descritas recentemente pelo nosso grupo;
- A expressão e atividade da cruzipaína e da pró-cruzipaína diminuem ao longo do processo de metaciclogênese;
- A expressão e atividade da chagasina aumentam ao longo do processo de metaciclogênese.

8- Referências

- ADADE C.M., CASTRO S.L., SOARES M.J. 2007. Ultrastructural localization of *Trypanosoma cruzi* lysosomes by aryl sulphatase cytochemistry. *Mícron*. **38**: 252–256.
- ANDREWS N.W. 1993. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. *Biol Res*. **26**:65-7.
- ANDREWS, N.W., ABRAMS, C.K., STATIN, S.L., GRIFFINS, G. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane poreforming activity at low pH. *Cell* **61(7)**:1277-87.
- ARARIPE J.R., CUNHA-E-SILVA N.L., LEAL S.T., DE SOUZA W., RONDINELLI E. 2004. *Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun*. **321(2)**:397-402.
- BARRET A.J., RAWLINGS N.G., WOESSNER J.F. 2004. Handbook of proteolytic enzymes. *Academic Press*.
- BRENER Z. 1985. Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. *Ann Soc Belg Med Trop*. 65 Suppl **1**:9-13.
- BROMME D., KALETA J. 2002. Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. *Curr Pharm Des*. **8**:1639-1658.

- BURLEIGH B.A., ANDREWS N.W. 1998. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol.* **1**:461-465.
- BURLEIGH B.A., WOOLSEY A.M. 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microb.***11**: 701-711.
- CAMARGO, E. P. 1964. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I- Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **6**: 93-100.
- CAMPETELLA O., MARTINEZ J, CAZZULO J.J. 1990. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett*, **55**: 145-9.
- CARVALHO, T.U., DE SOUZA, W. 1989. Study of mitochondrial organization in living resident and activated macrophages using the laser dye rhodamine 123. *J Leukoc Biol.* **45(6)**:498-502.
- CAZZULO J.J., CAZZULO FRANKE M.C., MARTINEZ J., FRANKE DE CAZZULO B.M. 1990. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* **1037**:186-91
- CAZZULO J.J., COUSO R., RAIMONDI A., WERNSTEDT C., HELLMAN U. 1989. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**:33-41.
- CAZZULO JJ, STOKA V, TURK V. 1997. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol Chem.* **378**:1-10.

- CHAGAS, C. 1909. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Eschizotrypanum cruzi* n., gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1**:1062-1909.
- CONTRERAS, V T, ARAUJO-JORGE, T C, BONALDO, M C, THOMAZ, N, BARBOSA, H S, MEIRELES, M N S L, GOLDENBERG S. 1988. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **83**: 123-133.
- CONTRERAS, V.T., SALES, J.M., THOMAZ, N., MOREL, C.M. AND GOLDENBERG, S. 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* **16**: 315-327.
- CORRÊA J.R., ATELLA G.C., MENNA-BARRETO R.S. SOARES M.J. 2007. Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: In Silico Gene Identification, Isolation, and Localization of Protein Expression Sites. *J. Eukaryot. Microbiol.* **54(3)**:297–302.
- CUNHA-E-SILVA NL, ATELLA GC, PORTO-CARREIRO IA, MORGADO-DIAZ JA, PEREIRA MG, DE SOUZA W. 2002. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* **214**:7-12.
- DE SOUZA W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des.* **8(4)**: 269-282.
- DE SOUZA, W, CARVALHO, TU, BENCHIMOL, M 1978. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. *Exp. Parasitol.*, **45**: 101-115.
- DE SOUZA, W. 1989. Cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Prog. Protistol.* **3**:87.

- DE SOUZA, W. 1999. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, capítulo 7, Brener, Z., Barral, M., Andrade, Z. (eds), 2nd ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., p. 88-126.
- DE SOUZA, W., DE CARVALHO, T.U., BENCHIMOL, M. AND CHIARI, E. 1978. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. *Exp. Parasitol.* **45**: 101-115.
- DORTA M.L., FERREIRA A.T., OSHIRO M.E., YOSHIDA N. 1995. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol.* **73**:285-289.
- DUBIN G. 2005. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci.* **62(6)**:653-69.
- DUSCHAK V.G., BARBOZA M., GARCIA G.A., LAMMEL E.M., COUTO A.S., ISOLA E. L. D. 2006. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitol.* **132**:345-355.
- EAKIN A.E., MCGRATH M.E., MCKERROW J.H., FLETTERICK R.J., CRAIK C.S. 1993. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol.Chem.* **268**:6115-6118.
- EAKIN A.E., MILLS A.A., HARTH G., MCKERROW J.H., CRAIK C.S. 1992. The sequence, organization and expression of the major cysteine proteinase (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **267**:7411-7420.
- ENGEL J.C., DOYLE P.S., HSIEH I., MCKERROW J.H. 1998a. Cysteine protease inhibitors cure na experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* **188**:725-734.

- ENGEL JC, DOYLE PS, PALMER J, HSIEH I, BAINTON DF, MCKERROW JH. 1998b. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci.* **111**: 597-606.
- ENGEL, JC, GARCÍA, CT, HSIEH, I, DOYLE, P S, MCKERROW, JH. 2000. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.*, **113**: 1345-1354.
- FERNANDES J.F., CASTELLANI O., KIMURA E., 1969. Physiological events in the course of the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, **61**:213-225.
- FIGUEIREDO DA SILVA A.A., CARVALHO VIEIRA L.D., KRIEGER M.A., GOLDENBERG S., TONIN ZANCHIN N.I., GUIMARAES B.G. 2007. Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. *J Struct Biol.* **157(2)**:416-423.
- FIGUEIREDO R.C., ROSA D.S., SOARES M.J. 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol.* **86(6)**:1213-8.
- FIGUEIREDO R.C., SOARES M.J. 2000. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* **86(5)**:413-8.
- FIGUEIREDO, R.C., STEINDEL, M., SOARES, M. J. 1994. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during *in vitro* cultivation. *Parasitol. Res.* **80**: 517-522.

- GONZALEZ CAPPA S.M., BRONZINA A., KATZIN A.M., GOLFERA H., DE MARTINI G.W., SEGURA E.L. 1980. Antigens of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. III. Humoral immune response and histopathology of immunized mice. *J Protozool.* **27(4):**467-71.
- HARTH G., ANDREWS N., MILLS A.A., ENGEL J.C., SMITH R., MCKERROW J.H. 1993. Peptidefluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **58(1):**17-24.
- IRVINE J.W., COOMBS G.H. & NORTH M.J. 1992. Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors of parasitic protozoa. *FEMS Microbiol. Lett.* **75:** 67-72.
- LANDFEAR S.M., IGNATUSHCHENKO M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* **115(1):**1-17.
- LARA FA, SANT'ANNA C, LEMOS D, LARANJA GA, COELHO MG, REIS SALLES I, MICHEL A, OLIVEIRA PL, CUNHA-E-SILVA N, SALMON D, PAES MC. 2007. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun.* **355:**16-22.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. AND RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:** 265-275.
- MARTINEZ-PALOMO A, DESOUZA W, GONZALEZ-ROBLES A. 1976. Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biol.* **69:**507-13.

- MCKERROW J.H., MCGRATH M.E, ENGEL J.C. 1995. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitology Today* **11**:279-282.
- MEIRELLES M.N., JULIANO L., CARMONA E., SILVA S.G., COSTA E.M., MURTA A.C.M., SCHARFSTEIN J. 1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**:175-184.
- MENDONÇA S.M., SILVA J.L.N, CUNHA-E-SILVA N., DE SOUZA W., LOPES U.G. 2000. Characterization of a Rab 11 homologue in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*, **243**: 179-185.
- MICHELS PA, MOYERSON J, KRAZY H, GALLAND N, HERMAN M, HANNAERT V. 2005. Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes. *Mol Membr Biol.* **22**:133-45.
- MILDER, R, DEANE, M. P. 1969. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. *J. Protozool.* **16**: 730-737.
- MONTEIRO A.C.S., ABRAHAMSON M., LIMA A.P.C.A., VANNIER-SANTOS M.A., SCHARFSTEIN, J. 2001. Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine proteases inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.* **114**: 3933-3942.
- MURTA A.C.M., PERSECHINI P.M., DE SOUTO PADRÓN T., DE SOUZA W., GUIMARÃES J. A., SCHARFSTEIN J. 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**:27-38.

- OKUDA, K, ESTEVA, M, SEGURA, EL, BIJOVSKY. 1999. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. *Exp. Parasitol.*, **92**: 223-231.
- OPPERDOES F.R, COTTEM D. 1982. Involvement of the glycosome of *Trypanosoma brucei* in carbon dioxide fixation. *FEBS Lett.* **143(1)**:60-4.
- OUAISSI M.A., DUBREMETZ J.F., SCHONECK R., FERNANDEZ-GOMEZ R., GOMEZ-CORVERA R., BILLAUT-MULOT O., TAIBI A., LOYENS M., TARTAR A., SERGHERAERT C. 1995. *Trypanosoma cruzi*: a 52-kDa protein sharing sequence homology with glutathione S-transferase is localized in parasite organelles morphologically resembling reservosomes. *Exp Parasitol.* **81**: 453-61.
- PANDEY K.C., SINGH N., ARASTU-KAPUR S., BOGYO M., ROSENTHAL P.J. 2006. Falstatin, a cysteine protease inhibitor of *Plasmodium falciparum*, facilitates erythrocyte invasion. *PLoS Pathog.* **2(11)**: e117.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A., MOREIRA C.J. 1994. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*--1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **89(4)**:603-618.
- PORTO-CARREIRO I, ATTIAS M, MIRANDA K, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA NL 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes endocytic pathway: Cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before reservosome storage. *Eur J Cell Biol* **79**: 858-869.
- REIS F.C., COSTA T.F., SULEA T., MEZZETTI A., SCHARFSTEIN J., BRÖMME D., MÉNARD R., LIMA A.P. 2007. The propeptide of cruzipain - a

potent selective inhibitor of the trypanosomal enzymes cruzipain and brucipain, and of the human enzyme cathepsin F. *FEBS J.* **274(5)**:1224-34.

- RIEKENBERG S., WITJES B., SARIC M., BRUCHHAUS I., SCHOLZE H. 2005. Identification of EhICP1, a chagasin-like cysteine protease inhibitor of *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* **579(7)**:1573-8.
- RZYCHON M., CHMIEL D., STEC-NIEMCZYK J. 2004. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol.* **51(4)**:861-73.
- SAJID M., MCKERROW J.H. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 1-21.
- SALMON D., DO AIDO-MACHADO R., DIEHL A., LEIDERT M., SCHMETZER O., LIMA A.P., SCHARFSTEIN J., OSCHKINAT H., PIRES J.R. 2006. Solution structure and backbone dynamics of the *Trypanosoma cruzi* cysteine protease inhibitor chagasin. *J Mol Biol.* **357(5)**:1511-21.
- SANDERSON S. J., WESTROP G. D., SCHARFSTEIN J., MOTTRAM J. C., COOMBS G. H. 2003. Functional conservation of a natural cysteine peptidase inhibitor in protozoan and bacterial pathogens. *FEBS Lett.* **542**: 12–16.
- SANT'ANNA C., DE SOUZA W., CUNHA-E-SILVA N. 2004. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal.* **10(5)**:637-46.
- SANT'ANNA C., Reservossomos de *Trypanosoma cruzi*: caracterização morfológica e análise proteômica. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- SANTOS CC, SANT'ANNA C, TERRES A, CUNHA-E-SILVA NL, SCHARFSTEIN J, DE A LIMA AP. 2005. Chagasin, the endogenous cysteine-

protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J Cell Sci.* **118**:901-15.

- SARIC M., VAHRMANN A., BRUCHHAUS I., BAKKER-GRUNWALD T., SCHOLZE H. 2006. The second cysteine protease inhibitor, EhICP2, has a different localization in trophozoites of *Entamoeba histolytica* than EhICP1. *Parasitol Res.* **100(1)**:171-4.
- SCOTT D.A., DOCAMPO R., DVORAK J.A., SHI S., LEAPMAN R.D. 1997. In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* **272(44)**:28020-9.
- SELZER P.M., PINGEL S., HSIEH I., UGELE B., CHAN V.J., ENGEL J.C., BOGYO M., RUSSEL D.G., SAKANARI J.A., MCKERROW J.H. 1999. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **142**: 11105-11022.
- SOARES MJ, DE SOUZA, W. 1988. Cytoplasmic organelles of Trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **20**: 349-361.
- SOARES, M.J., DE SOUZA, W. 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **77**: 461-469.
- SOARES, M.J., SOUTO-PADRÓN, T, DE SOUZA, W. 1992. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.* **102**: 157-167.
- SOARES, M.J., SOUTO-PADRÓN, T. BONALDO, M. C., GOLDENBERG, S. AND DE SOUZA, W. 1989. A steriological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **75**: 522-527.

- SOUTO-PADRÓN, T, CAMPETELLA, OE, CAZZULO, JJ., DESOUZA, W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.*, **96**: 495-490.
- TAO K., STEARNS N.A., DONG J., WU Q.L., SAHAGIAN G.G. 1994. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**:19-27.
- TOMÁS A.M., KELLY J.M. 1996. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. *Mol Biochem Parasitol.* **76(1-2)**:91-103.
- TOMAS A.M., MILES M.A., KELLY J.M. 1997. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem.* **244**:596-603.
- TORRES C., PEREZ-VICTORIA F.J., PARODI-TALICE A., CASTANYS S., GAMARRO F. 2004. Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* **54**:632-46.
- VATARUNAKAMURA C, UEDA-NAKAMURA T, DE SOUZA W. 2005. Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. *FEMS Microbiol Lett.* 242:227-30
- VERCESI A.E., MORENO S.N., DOCAMPO R. 1994. Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* **304 (Pt 1)**:227-233.

- VIEIRA M, DUTRA JM, CARVALHO TM, CUNHA-E-SILVA NL, SOUTO-PADRÓN T, SOUZA W. 2002. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol.* **118(6)**:491-500.
- WEBSTER P., RUSSELL D.G. 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol Today.* **9(6)**:201-6.
- WHO Division of Control of Tropical Diseases - Chagas Disease Elimination – Burdens and Trends. 2000. A partir do website <http://www.who.int/ctd/html/chagburtre.html>. Última atualização: 22/12/2006.
- ZELEDÓN R., BOLAÑOS R., ROJAS M. 1984. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop.* **41(1)**:39-43.

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](#)