

Daniele dos Santos Andrade

“Mecanismos de Invasão de Células Não-Fagocíticas pelo  
*Trypanosoma cruzi*: Envolvimento de Subconjuntos de  
Receptores Acoplados a Proteína G-regulatória”

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



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Andrade, Daniele dos Santos

Título: “Mecanismos de Invasão de Células Não-Fagocíticas pelo *Trypanosoma cruzi*:  
Envolvimento de Subconjuntos de Receptores Acoplados a Proteína G-regulatória”

Rio de Janeiro, UFRJ, IBCCF<sup>o</sup>, 2008

Xiv, 169 folhas

Tese: Doutor em Ciências

1. Cininas 2. Endotelina 3. *Trypanosoma cruzi*

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Molecular sob orientação do Dr. Júlio Scharfstein e co-orientação da Dra. Ana Paula C.A. Lima. O laboratório é integrante do Programa de Imunobiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O trabalho foi desenvolvido com auxílio financeiro das seguintes entidades:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo a Pesquisa do estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB/UFRJ)

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,  
mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e  
pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

## **Agradecimentos**

- Em primeiro lugar quero agradecer a Deus por me permitir chegar até aqui e concluir mais essa etapa na minha vida
- Gostaria de agradecer ao Prof. Júlio, orientador e amigo, por acreditar e investir em mim todos esses anos. Obrigada pelas críticas e a oportunidade de crescer cientificamente e pessoalmente.
- A Prof<sup>a</sup>. Ana Paula, pela amizade, incentivo, confiança, pelas conversas intermináveis e horas de almoço perdidas. Obrigada pela atenção, paciência e ajuda em todos os momentos.
- Ao Dr. Herbert Tanowitz, por ter me recebido com tanto carinho em seu laboratório durante minha estadia em Nova Iorque. E a todos do seu laboratório que foram muito atenciosos e gentis.
- A todos os colaboradores que sempre foram muito dedicados e amáveis
- A Professora Verônica Morandi e ao Marcos, obrigada pela paciência e esforço em sempre conseguir as culturas de HUVECs e, acima de tudo, obrigada pela amizade
- Ao pessoal do laboratório: Alda, Ana Carolina, Daniela, Leila (amiga da vida também!) Vinícius, Prof. Erik, Rafaela, Larissa, Ilka, Isabela, Ângela, Flávia, Tatiana, Giancarla, Luciana, Mayra, Marília, Edna, Iracema, Juliana.
- A Alessandra, meu “apêndice” e eterna amiga – uma pessoa maravilhosa com quem tenho a felicidade de conviver todo esse tempo. Obrigada pelo carinho e ajuda.
- A Verônica, minha querida amiga. Por tudo que já passamos juntas! Obrigada pela amizade e cumplicidade.

- A querida Gabriela, “minha mais nova subunidade ribossomal”- uma pessoa com quem tenho o prazer de conviver e ter ajudado nos seus primeiros momentos de laboratório. Obrigada pela confiança e amizade.

- As minhas grandes amigas: Karla, Tati e Sylvia, pela amizade de todos esses anos, e por estarem sempre presentes na minha vida.

- A minha família: meus queridos e amados pais e irmão: Wagner, Maria e Júnior. Pelo apoio e amor incondicional. Sem vocês eu não teria conseguido.

- As minhas queridas: avós: Maria e Arlete e dinda Marise, que sempre deram muita força.

- Ao Leonardo, meu eterno Momô, obrigada por tudo.

## Lista de Abreviaturas

- [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> – concentração de cálcio intracelular
- A8B – antagonista do receptor C5a
- AA- ácido aracdônico
- AC – adenilato ciclase
- AKT – proteína cinase B
- AMPC – adenosina mono fosfato cíclica
- B<sub>1</sub>R – receptor B<sub>1</sub> de bradicinina
- B<sub>2</sub>R- receptor B<sub>2</sub> de bradicinina
- BK – bradicinina
- C5aR- receptor da anafilotoxina C5a
- CAMs- moléculas de adesão celular
- Cap – captopril; inibidor da ECA
- CHO-ETaR – célula de ovário de Hamster transfectada com o gene do ETaR
- CHO-ETbR - célula de ovário de Hamster transfectada com o gene do ETbR
- COX-2 – ciclooxigenase 2
- CP – cisteíno-protease
- CPM – carboxipeptidase M
- CPN - carboxipeptidase N
- CTGF – fator de crescimento de tecido conjuntivo
- CZP - cruzipaina
- DC- célula dendrítica
- DMEM – meio “Dulbecco’s modified eagle”
- DNA – ácido desoxirribonucléico



E-64 – trans-Epoxy succinil-L-leucil-amido(4-guanidino)butano

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECE - enzima conversora de endotelina

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EEA-1 – antígeno de endossoma inicial 1

eGPI - âncora de glicofosfatidilinositol de epimastigota

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPI - epimastigotas

ET-1 - endotelina-1

ETaR – receptor de endotelina

ETbR - receptor de endotelina

FITC – Fluoreceína

GIPLs - âncoras livres de glicosilfosfatidilinositol

GPCRs- receptores acoplados a proteína G regulatória

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

HBSS – solução salina balanceada de Hank's

HK – cininogênio de alto peso molecular

HOE 140 – antagonista do receptor B<sub>2</sub>

HSMC – célula de músculo liso humano

HUVEC – célula endotelial de veia de cordão umbilical humano

i.p. – intraperitoneal

ICAM-1 – molecular de adesão intracelular

IFN- $\gamma$  - Interferon gamma

IgG – imunoglobulina G

IP3 – inositol 3 fosfato

LBK – lisil bradicinina

Lis – lisinopril; inibidor da ECA

LIT – infusão de fígado – tryptose

LPS- lipopolissacarídeo

MAPK – proteína cinase ativada por mitógenos

MCP-1 – proteína quimioatraente de macrófagos

MDL-12 – cis-N-(2-Phenylcyclopentyl)azacyclotridec-1-em-2-amine, HCL

mGPI - âncora de glicofosfatidilinositol de metacíclico

MTs - metacíclicos

M $\beta$ CD – metil- $\beta$ -ciclodextrina

NEP – endopeptidase neutra

NF- $\kappa$ B – fator de transcrição nuclear – $\kappa$ B

NO- óxido nítrico

NSSC – canais independentes de voltagem (cátions não seletivos)

OPB – oligopeptidase B

PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos

PBS – salina tamponada em fosfato

pChag – epimastigota transfectado com o plasmídeo pTEX contendo uma cópia do gene da chagasina e submetido ao crescimento com 800  $\mu$ g/ml de geneticina

PCR – reação de polimerase em cadeia

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E2

PGN – peptídeoglicanas

PI-3K – fosfatidil inositol 3 cinase

PLA2 – fosfolipase A2

PMN – polimorfonucleares

POP - prolil-oligopeptidase

PTx – toxina pertussis

RANTES – quimiocina CCL5

RNA – ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

s.c. – subcutâneo

SA – ácido siálico

SFB – soro fetal bovino

SOCC – canais independentes de voltagem (seletivos para  $\text{Ca}^{+2}$ )

TCT- tripomastigotas de cultura de tecido

TGF- $\beta$  - fator  $\beta$  de crescimento tecidual

tGPI – mucina ancorada por GPI de tripomastigota

TLR – receptores do tipo toll

TLR2<sup>-/-</sup> - nocautes para o receptor do tipo toll 2

TNF- $\alpha$  - fator  $\alpha$  de necrose tumoral

TS – trans-sialidase

VCAM-1 – molécula de adesão vascular

VS $\phi$  - Um-F-hF-VS $\phi$ ; inibidor seletivo de cruzipafina

## RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico Doença de Chagas, é um parasita intracelular obrigatório em hospedeiros mamíferos. Para invadir a célula hospedeira, os tripomastigotas estabelecem contatos adesivos com a célula alvo, estabelecendo interações e deflagrando sinais que permitem a ativação de receptores de superfície. Trabalhos clássicos indicam que a indução de  $[Ca^{2+}]_i$  através da ativação de receptores acoplados a proteínas G-regulatórias (GPCRs) promove a internalização do parasita devido à exocitose lisossomal. Por exemplo, tripomastigotas valem-se da cruzipaína para processar cininogênios, liberando cininas. Apesar de serem sensíveis à degradação por metalopeptidases, como a enzima conversora de angiotensina (ECA), as cininas podem ativar células que expressam receptores de cininas (BKRs) constitutivos ( $B_2R$ ) ou induzidos ( $B_1R$ ). Nesse trabalho, demonstramos que a ativação de BKRs no mecanismo de invasão é condicionado: (i) pela natureza da célula hospedeira (célula endotelial ou músculo liso); (ii) pelo estado de ativação dessas células não-fagocíticas. Além da importância de BKRs, evidenciamos a interdependência funcional entre receptores de endotelina (ETaR ou ETbR) e receptores de tipo Toll-like (TLR2/4) e receptores para anafilotoxina C5a (C5aR). Nossos resultados sugerem que a invasão de células não-fagocíticas pelos tripomastigotas requer a formação de plataformas de sinalização envolvendo o agrupamento de diferentes subconjuntos de GPCRs e TLRs, possivelmente recrutados para as regiões de interação entre o parasita e a célula hospedeira. Além disso, existem evidências de uma contribuição diferencial desses receptores nas etapas de entrada versus retenção dos tripomastigotas na célula hospedeira.

## ABSTRACT

The infection of non-phagocytic host cells by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes is the final outcome of a complex communication process, forged by intimate host-parasite adhesive interactions. Classical studies indicated that parasite-induced lysosomal exocytosis, a  $[Ca^{2+}]_i$ -dependent response transduced by G-protein coupled receptors (GPCR), promotes the endocytic internalization of the parasite. Following the discovery that trypomastigotes proteolytically liberate short-lived kinin peptides from kininogens, our group showed that activation of bradykinin receptors (BKR) potentiates host cell invasion. In the present study, we demonstrate that the parasite ability to exploit the constitutive (B<sub>2</sub>) or inducible (B<sub>1</sub>) BKR for purposes of invasion is conditioned (i) by the nature of the host cell (endothelial cell or smooth muscle) (ii) by the state of activation of these non-phagocytic cells. Further highlighting the complexity of the invasion mechanism, we now show evidence that this process depends on the functional cooperation of other GPCRs (i.e., endothelin receptors ETaR and ETbR and C5a anaphilotoxin receptors) and Toll-like receptors (TLR2/4). Our results suggest that host cell invasion by trypomastigotes may depend on recruitment/assembly of distinct sub-sets of host cell receptors in signaling platforms presumably formed within the interaction regions formed by juxtaposed host/parasite plasma membranes. Also, there are evidences of a differential contribution of these receptors at the entry versus retention process of trypomastigotes in host cells.

# Índice

---

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Introdução</b> .....  | 1  |
| 1.1 - Doença de Chagas .....  | 1  |
| 1.2 – Mecanismos de Invasão de Células Não-Fagocíticas pelo <i>T. cruzi</i> .....                   | 3  |
| 1.3 - Sinais de ativação celular envolvidos na internalização de TCTs .....                         | 7  |
| 1.3.1 – Participação de cinases na invasão celular .....  | 10 |
| 1.3.2 – Sinalização celular mediada pela oligopeptidase B .....                                     | 13 |
| 1.3.3 – Envolvimento da cruzipaina nos mecanismos de invasão celular .....                          | 15 |
| 1.3.4 – Mecanismos de invasão dependentes de TGF- $\beta$ .....                                     | 18 |
| 1.4 - Sistema Calicreína-Cininas .....  | 19 |
| 1.4.1 - Receptores de Cininas .....   | 24 |
| 1.4.2 – Envolvimento do sistema de cininas na fisiopatogenia da Doença de Chagas Experimental ..... | 28 |
| 1.5 – Receptores do tipo Toll na Doença de Chagas .....   | 29 |
| 1.5.1 - Super família de glicoproteínas do tipo mucina do <i>T. cruzi</i> .....                     | 33 |
| 1.6 - Alterações da Microcirculação na Doença de Chagas .....                                       | 37 |
| 1.6.1 - Papel dos Receptores de Endotelina na Doença de Chagas .....                                | 38 |
| 1.6.2 - Papel da Endotelina na infecção Chagásica Experimental .....                                | 43 |
| <b>2- Justificativa</b> .....   | 45 |
| <b>3- Objetivo Geral</b> .....  | 47 |
| 3.1 - Objetivos Específicos .....   | 47 |
| <b>4 - Materiais e Métodos</b> .....  | 48 |
| 4.1 - Parasitas .....   | 48 |
| 4.2 - Células .....   | 48 |
| 4.3 - Imunofluorescência / Confocal .....   | 50 |
| 4.4 – PCR em tempo real: Indução de B <sub>1</sub> R .....  | 51 |
| 4.5 - Ensaio de Invasão .....   | 52 |
| 4.6 - Entrada x Retenção na célula hospedeira .....   | 54 |
| 4.7 - Determinação da produção da citocina IL-6 e da quimiocina IL-8 <i>in vitro</i> .....          | 55 |
| 4.8 - Determinação da molécula de adesão E-selectina <i>in vitro</i> .....                          | 55 |
| 4.9 - Análise Histopatológica .....   | 56 |

|   |            |
|---|------------|
| 4.10 - PCR em tempo real: B <sub>1</sub> R <sup>+/+</sup> x B <sub>1</sub> R <sup>-/-</sup> .....                                 | 57         |
| 4.11 - Análises Estatísticas .....  | 58         |
| <b>5 - Resultados</b> .....   | <b>59</b>  |
| 5.1 – Envolvimento de receptores de endotelina na invasão celular .....   | 59         |
| 5.2 – Cooperação entre GPCRs: ETbR/C5aR .....   | 63         |
| 5.3- Análise das vias de sinalização ativadas pelos tripomastigotas Dm28c .....   | 65         |
| 5.4 – iECA influenciam a formação de subconjuntos de GPCRs responsáveis pela<br>invasão de HUVECs (repouso).....                  | 73         |
| 5.5 - iECA é um pré-requisito para recrutamento de TLR2/4 nos subconjuntos<br>funcionais formados por B <sub>2</sub> R/ETbR ..... | 75         |
| 5.6 – Vias de sinalização independentes: B <sub>2</sub> Rs e C5aR.....  | 77         |
| 5.7 – Análise da contribuição diferencial de GPCRs versus TLRs nas etapas de<br>entrada x retenção dos TCTs .....                 | 79         |
| 5.8 – Ativação de células endoteliais pelos TCTs Dm28c .....  | 82         |
| 5.9 – TCTs da cepa Colombiana são capazes de ativar HUVECs, sinalizando invasão<br>celular pela via B <sub>1</sub> R/TLR2/4 ..... | 92         |
| 5.10 - Indução do receptor B <sub>1</sub> pela tGPI-mucina: Participação da via de sinalização do<br>receptor TLR2.....           | 94         |
| 5.11 – Envolvimento do subconjunto B <sub>1</sub> R / TLR2 na invasão de HUVECs “ativadas” .....                                  | 96         |
| 5.12 – Vias independentes de sinalização: B <sub>1</sub> R-C5aR.....  | 100        |
| 5.13 – Análise da contribuição de B <sub>1</sub> R nas etapas de entrada x retenção dos TCTs na<br>célula hospedeira.....         | 102        |
| 5.14 – Avaliação do papel de B <sub>1</sub> R na patogênese da cardite chagásica.....   | 104        |
| <b>6 – Discussão</b> .....  | <b>107</b> |
| <b>7 - Referências Bibliográficas</b> .....   | <b>125</b> |

## **1. Introdução**

### **1.1 - Doença de Chagas**

A Doença de Chagas afeta aproximadamente 20 milhões de pessoas na América Latina e é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Estimativas da Organização Mundial de Saúde indicam que mais de 16 milhões de pessoas encontra-se em áreas endêmicas da América do Sul e da América Central e 25% da população total está em área de risco (WHO, 2006).

O *T. cruzi* é transmitido através das fezes de insetos hemípteros hematófagos e apresenta-se em três formas evolutivas distintas: tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas. As formas infectivas (tripomastigotas) rapidamente entram na corrente sanguínea, de onde irão disseminar para múltiplos tecidos. Após infectar macrófagos, músculos e outros vários tipos celulares, os tripomastigotas metacíclicos escapam rapidamente do vacúolo parasitóforo para o citoplasma, onde se transformam em amastigotas (estágio replicativo) antes de se diferenciar em formas tripomastigotas. Após 5-6 dias a célula hospedeira rompe, liberando um grande número de tripomastigotas infectivos nos espaços intersticiais. Envolvendo múltiplos órgãos, a doença aguda caracteriza-se por uma alta parasitemia, febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Casos fatais podem ocorrer quando o miocárdio ou o sistema nervoso central é seriamente comprometido. Na maioria dos casos, a infecção aguda é controlada quando a resposta imune adaptativa se consolida. Após uma fase indeterminada caracterizada pela ausência de sintomas clínicos, baixa parasitemia e sorologia positiva, cerca de 30% a 40% dos pacientes infectados desenvolvem um comprometimento cardíaco progressivo (cardiopatia crônica chagásica). Uma fração desses apresenta complicações no sistema digestivo causadas pela denervação da musculatura lisa do



esôfago e do cólon (megasíndrome digestiva) (revisado por MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Fatores do hospedeiro, cepa do parasita, via de infecção e número de parasitas influenciam a sobrevivência e progressão dos sintomas agudos para a doença crônica (revisado por MARIN-NETO *et al.*, 2007). Análises de autópsias de corações de pacientes chagásicos crônicos sintomáticos revelaram a presença de um intenso processo inflamatório, associado à baixa carga parasitária (JONES *et al.*, 1993). Durante muito tempo, essas evidências sugeriram a participação de autoimunidade na patogênese da miocardite crônica (JONES *et al.*, 1993). Entretanto, o emprego de técnicas mais sensíveis como a reação de polimerização em cadeia (PCR) e imunocitoquímica, evidenciou uma relação positiva entre a presença de parasitismo intracardíaco e a gravidade da cardite (JONES *et al.*, 1993). Além disso, estudos em camundongos cronicamente infectados mostraram uma relação direta entre a persistência do parasita no miocárdio e a severidade da Doença, levando ao desenvolvimento da cardiomiopatia crônica (ZHANG e TARLETON, 1999).

Ainda que com uma eficácia variável, algumas drogas são utilizadas no tratamento da Doença de Chagas, como é o caso do benznidazol e nifurtimol. Os dois agentes mostraram-se efetivos na redução da duração e da severidade da doença na fase aguda. Porém, essas drogas são tóxicas e causam diversos efeitos colaterais nos pacientes, levando normalmente à interrupção do tratamento. Além disso, esses medicamentos são administrados somente na fase aguda, a qual é dificilmente detectada em áreas endêmicas (WHO, 2006).

Tal como ocorre em humanos, a patologia observada em camundongos infectados com *T. cruzi* é variável, sendo influenciado pela cepa do parasita e pelo genótipo do hospedeiro e do *T. cruzi*. Diferenças de virulência e patogenicidade entre

cepas de *T. cruzi* tem sido atribuídas a diversidade genética intraespecífica (revisado por MACEDO e PENA, 1998; TIBAYRENC, 2003).

O *T. cruzi* é dividido em dois grupos ou linhagens filogenéticas, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (MACEDO e PENA, 1998; SOUTO *et al.*, 1996; ZINGALES *et al.*, 1999) embora existam subdivisões dentro desses grupos (MACHADO e AYALA, 2001; KAWASHITA *et al.*, 2001). A diversidade entre os parasitas isolados foi observada, inicialmente, baseado em dados bioquímicos, ecológicos e epidemiológicos (MILES *et al.*, 1978). Mais recentemente, vários marcadores moleculares foram identificados permitindo a separação de duas grandes linhagens e maior acurácia na discriminação dos isolados. Esses marcadores moleculares incluem o gene 24S $\alpha$  rDNA e a sua sequência promotora (SOUTO *et al.*, 1996; NUNES *et al.*, 1997), a região intergênica de genes repetidos em tandem de mini-exon (SOUTO *et al.*, 1996) e microssatélites de DNA (OLIVEIRA *et al.*, 1998). As cepas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II circulam em ambientes ecologicamente distintos; enquanto o *T. cruzi* I participa do ciclo de transmissão silvestre, o *T. cruzi* II predomina no ciclo de transmissão doméstico da Doença de Chagas, sendo responsáveis por infecções com parasitemia potente em áreas endêmicas (BRIONES *et al.*, 1999; ZINGALES *et al.*, 1999). Cabe mencionar que alguns isolados de parasitas possuem características genéticas híbridas (SOUTO *et al.*, 1996, STOLF *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2006). De fato, uma terceira linhagem foi recentemente caracterizada, sua origem sendo tentativamente atribuída a cruzamentos entre formas sexuadas de *T. cruzi* (FREITAS *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2006)

## **1.2 – Mecanismos de Invasão de Células Não-Fagocíticas pelo *T. cruzi***

Após mais de duas décadas de estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na infecção de células mamíferas, tornou-se evidente que existem importantes diferenças entre tripomastigotas metacíclicos (MT) e tripomastigotas

derivados de células mamíferas infectadas (TCT). Apesar dessas distinções, o processo de invasão pode ser esquematicamente separado em duas etapas distintas: adesão e sinalização. O processo de adesão é mediado por moléculas de superfície cuja expressão é rigorosamente controlada durante a morfogênese do *T. cruzi*. Entre as moléculas de adesão melhor caracterizadas, destacam-se os membros da superfamília das transsialidase/sialidase (TS) (ALVES *et al.*, 1986; SCHENCKMAN *et al.*, 1991; CAMPETELLA *et al.*, 1992; CROSS e TAKLE, 1993). As TS são glicoproteínas cuja expressão é variável ao longo do ciclo de vida do parasita, sendo mais abundantes na superfície das TCT do que em MT (PEREIRA-CHIOCOLA *et al.*, 2000). Apesar de altamente heterogêneas, as diferentes TS parecem desempenhar funções similares durante a invasão.

Estudos comparativos entre MT e TCT revelaram diferenças importantes quanto à composição de moléculas de adesão celular (RAMIREZ *et al.*, 1993; RUIZ *et al.*, 1993;1998; SCHENCKMAN *et al.*, 1993). Os estudos com MT revelam marcantes diferenças fenotípicas entre cepas de *T. cruzi* (revisado por YOSHIDA, 2006). Metacíclicos altamente invasivos (cepa CL) expressam a glicoproteína gp82, enquanto que metacíclicos pouco infectivos (cepa G) expressam altos níveis de gp90 e gp35/50 (revisado por YOSHIDA, 2006). As glicoproteínas de superfície do *T. cruzi*, gp90 e gp82, pertencem ao grupo II da superfamília multigênica trans sialidase (família gp85/TS) (Do CARMO *et al.*, 2002). Enquanto que as gp35/50 são glicoproteínas do tipo mucina e constituem outro grupo de moléculas implicadas na invasão da célula hospedeira (MORTARA *et al.*, 1992; SCHENCKMAN *et al.*, 1993).

A adesão do parasita à superfície da célula hospedeira por si só não garante o seu acesso ao meio intracelular: o sucesso dessa empreitada requer a ativação de vias de sinalização específica. Ensaio com a cepa CL revelaram que a proteína gp82 promove

a entrada do metacíclico nas células hospedeiras mediante ativação de cascatas de sinalização dependentes da ativação de proteínas tirosina cinases, fosfolipase C e IP<sub>3</sub>, levando à mobilização de cálcio (possivelmente de retículo endoplasmático) tanto na célula hospedeira quanto no parasita (RUIZ *et al.*, 1998; YOSHIDA *et al.*, 2000). Vale mencionar que a glicoproteína gp82 liga-se às mucinas de células do tecido gástrico, promovendo a invasão do metacíclico no epitélio da mucosa gástrica (NEIRA *et al.*, 2003). Mais recentemente, foi demonstrado que a gp82 é capaz de promover a despolimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira, de maneira dependente de cálcio, resultando no aumento da invasão da célula pelo metacíclico da cepa CL (CORTEZ *et al.*, 2006). O envolvimento da gp35/50 foi recentemente investigado. Observou-se que essa glicoproteína é expressa tanto em MT quanto em epimastigotas. Assim como a gp82, que se liga à célula hospedeira, a gp35/50 promove a entrada do MT na célula induzindo aumento transitório de cálcio intracelular tanto nos MT como na célula hospedeira (RUIZ *et al.*, 1998; YOSHIDA *et al.*, 2000). Finalmente, estudos sobre a função da gp90 indicam que essa glicoproteína modula negativamente a invasão de MT (MÁLAGA e YOSHIDA, 2001, revisado por YOSHIDA, 2006). Curiosamente, a gp90 é incapaz de induzir o aumento transitório de cálcio intracelular na célula mamífera ou no parasita (RUIZ *et al.*, 1998). É importante ressaltar que as glicoproteínas acima referidas não estão presentes em TCT, fato que sugere que devam executar funções exclusivamente relacionadas com o estabelecimento da infecção pelas formas infectivas presentes no vetor triatomíneo.

Conforme já mencionado, estudos sobre a interação de TCT com células não-fagocíticas sugeriram que a trans-sialilação é importante para a aderência do parasito às células hospedeiras (PREVIATO *et al.*, 1985; SCHENKMAN *et al.*, 1991; SCHENKMAN e EICHINGER, 1993). Trabalhos subsequentes mostraram que TS

recombinantes possuem outros domínios de adesão celular (ALVES *et al.*, 1986; MING *et al.*, 1993; GIORDANO *et al.*, 1994; DIAS *et al.*, 2008).

Algumas das moléculas de adesão do *T. cruzi* são membros de uma família multigênica que inclui a trans-sialidase/sialidase, (ALVES *et al.*, 1986; SCHENCKMAN *et al.*, 1991; CAMPETELLA *et al.*, 1992; CROSS e TAKLE, 1993), que ligam-se a resíduos de galactose, ácido siálico, heparan sulfato e heparina na superfície da célula hospedeira (ARAYA *et al.*, 1994). As TS são proteínas que apresentam uma expressão variável ao longo do ciclo de vida do parasita, sendo mais abundantes na superfície das formas infectivas (tripomastigotas) (PEREIRA-CHIOCOLA *et al.*, 2000), estando implicadas no reconhecimento e invasão da célula hospedeira (revisado por YOSHIDA, 2006). Apesar de altamente heterogêneas, as diferentes TS podem apresentar funções similares durante a invasão. No entanto, a adesão do parasita à superfície da célula hospedeira não garante o seu acesso ao meio intracelular. A invasão requer a ativação de vias de sinalização específicas (MING, *et al.*, 1995; BURLEIGH e ANDREWS, 1995a).

Estudos dos membros da família TS/gp85, revelaram a existência de uma seqüência do tipo fibronectina (OUAISSI *et al.*, 1986), um domínio de ligação a laminina (GIORDANO *et al.*, 1994), e mais recentemente, um domínio carboxi-terminal capaz de se ligar especificamente à citoqueratina 18 (MAGDESIAN *et al.*, 2001), sendo todos esses domínios importantes para invasão da célula hospedeira.

Apesar dos MT possuírem muito menos atividade TS (CHAVES *et al.*, 1993), isso não parece prejudicar a sua capacidade de invadir células. Os MT entram na célula hospedeira e após o primeiro ciclo da invasão celular geram tripomastigotas sanguíneos. No entanto, os MT não são alvo da resposta adaptativa imune do hospedeiro, enquanto o TCT tem que subverter essa resposta para sobreviver. Então, além dos fatores de

virulência já associados com a TS, acredita-se que as grandes quantidades de TS produzidas pelos TCT permitem que eles possam escapar do vacúolo parasitóforo e se diferenciar mais rapidamente, facilitando sua sobrevivência intracelular no hospedeiro (RUBIN-DE-CELIS *et al.*, 2006).

Além dos mecanismos envolvidos na ligação parasita-hospedeiro, sabe-se que os eventos de transdução de sinal que acarretam na liberação de  $[Ca^{+2}]_i$  para o citosol da célula hospedeira, estão envolvidos no desencadeamento do processo de internalização (MORENO *et al.*, 1994; YAKUBU *et al.*, 1994; TARDIEUX *et al.*, 1994; RODRIGUEZ *et al.*, 1995; DORTA *et al.*, 1995; WILKOWSKY *et al.*, 1996).

### **1.3 - Sinais de ativação celular envolvidos na internalização de TCT**

A invasão de células fagocíticas (macrófagos) por tripomastigotas ocorre tanto por um processo ativo (entrada provocada pelos tripomastigota) quanto por um processo passivo (fagocitose) (MEIRELLES *et al.*, 1982; VIEIRA *et al.*, 1994; revisado por CARVALHO *et al.*, 1999). Já a invasão de células não-fagocíticas ocorre apenas por um processo ativo (TARDIEUX *et al.*, 1992).

Dados da literatura demonstram que o dismantelamento do citoesqueleto de actina resulta em aumento na entrada dos TCT da cepa Y em células não-fagocíticas, pela via mediada pela membrana plasmática, com vacúolos lamp-1 negativos (WOOLSEY e BURLEIGH, 2004; ANDRADE e ANDREWS, 2004). Apesar disso, a despolimerização dos filamentos de actina proporciona também um aumento na saída desses parasitas da célula, diminuindo a retenção (ANDRADE e ANDREWS, 2004). Outros relatos sugerem que os TCT da cepa Dm28c necessitam do citoesqueleto de actina para a invasão de células de músculo liso humano (HSMCs), e que o tratamento com drogas que levam à sua despolimerização prejudicam tanto a entrada como a retenção do parasita na célula hospedeira (SANTOS *et al.*, em preparação). Esses dados

são corroborados por um trabalho recente de FERREIRA e cols. que demonstram que os tripomastigotas metacíclicos das cepas G e CL possuem necessidades distintas do citoesqueleto de actina para a invasão. Enquanto a cepa CL, do mesmo subgrupo do isolado Y, é capaz de induzir a despolimerização de F-actina para invadir a célula, a cepa G, do mesmo grupo do isolado Dm28c, que necessita de filamentos de actina íntegros para entrar em células HeLa (FERREIRA *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo, a sinalização para a modulação da F-actina na invasão das duas cepas de parasita foi atribuída à glicoproteínas de superfície gp82 e gp35/50 respectivamente (FERREIRA *et al.*, 2006). Podemos sugerir que a dependência ou não do citoesqueleto de actina seja particular para cada subgrupo do *T. cruzi*, onde o grupo II, contendo as cepas Y e CL, necessita do desmantelamento da F-actina, enquanto o grupo I, contendo os isolados Dm28c e G, necessita desse citoesqueleto íntegro. Esse modelo de invasão utilizado pelos TCT Dm28c e G é similar ao observado por entero-bactérias patogênicas intracelulares, como *Listeria*, *Yersinia*, *Shigella* e *Salmonella*, que promovem o rearranjo dos filamentos de actina no local de invasão abaixo da membrana plasmática (COSSART *et al.*, 2004), um mecanismo que se assemelha à endocitose.

Ainda que o disparo de cascatas de ativação intracelular tanto na célula alvo quanto no parasita (MORENO *et al.*, 1994) possa ser decorrente de interações entre moléculas de adesão dos TCT com seus receptores expressos na superfície da célula alvo, diversos artigos destacam a importância da liberação de  $[Ca^{+2}]_i$  no desencadeamento do processo de internalização (MORENO *et al.*, 1994; YAKUBU *et al.*, 1994; TARDIEUX *et al.*, 1994; RODRIGUEZ *et al.*, 1995; DORTA *et al.*, 1995; WILKOWSKY *et al.*, 1996).

Ao longo de vários anos diversos grupos têm investigado os mecanismos moleculares ativados pelos tripomastigotas ao interagir com a célula hospedeira, com o

objetivo de caracterizar moléculas do parasita envolvidas no processo, bem como a sinalização intracelular induzida por esses parasitas para invadirem as células. Como por exemplo, (i) ativação do receptor de TGF- $\beta$ ; (ii) uma via de invasão dependente da serino-protease oligopeptidase B; (iii) via mediada pela cruzipaína; (iv) via com participação da gp82 e sinalização de cálcio bi-direcional; (v) TS estimulando sinalização via PI3K, com ativação de AKT; (vi) ativação de adenilato ciclase, e aumento dos níveis de AMPc intracelular (BURLEIGH e WOOLSEY, 2002)

Durante o processo de invasão, os tripomastigotas elicitam uma resposta de elevação de transientes de cálcio intracelular assincrônica e repetitiva nas células de mamíferos (MORENO *et al.*, 1994; TARDIEUX *et al.*, 1994; CALER *et al.*, 2000; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2000). Essas mudanças nos níveis intracelulares de cálcio regulam a invasão do parasita promovendo rearranjos dos microfilamentos de actina (RODRÍGUEZ *et al.*, 1995) e fusão da membrana plasmática com os lisossomos (RODRÍGUEZ *et al.*, 1997). Os sinais de transientes de  $[Ca^{+2}]_i$  são gerados de forma lenta, sendo observados após 1 ou 2 minutos de contato com os tripomastigotas (MORENO *et al.*, 1994), sugerindo que a proximidade com a célula hospedeira seja um pré-requisito para a indução da sinalização de cálcio intracelular (CALER *et al.*, 2000; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Estudos posteriores demonstraram também que o aumento dos níveis de AMPc na célula hospedeira potencializam a mobilização de cálcio intracelular e a exocitose de lisossomos (RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Foi observado ainda que os tripomastigotas são capazes de ativar a enzima adenilato ciclase da célula hospedeira, levando a um aumento nos níveis de AMPc na célula, potencializando a sua invasão (RODRIGUEZ *et al.*, 1999).



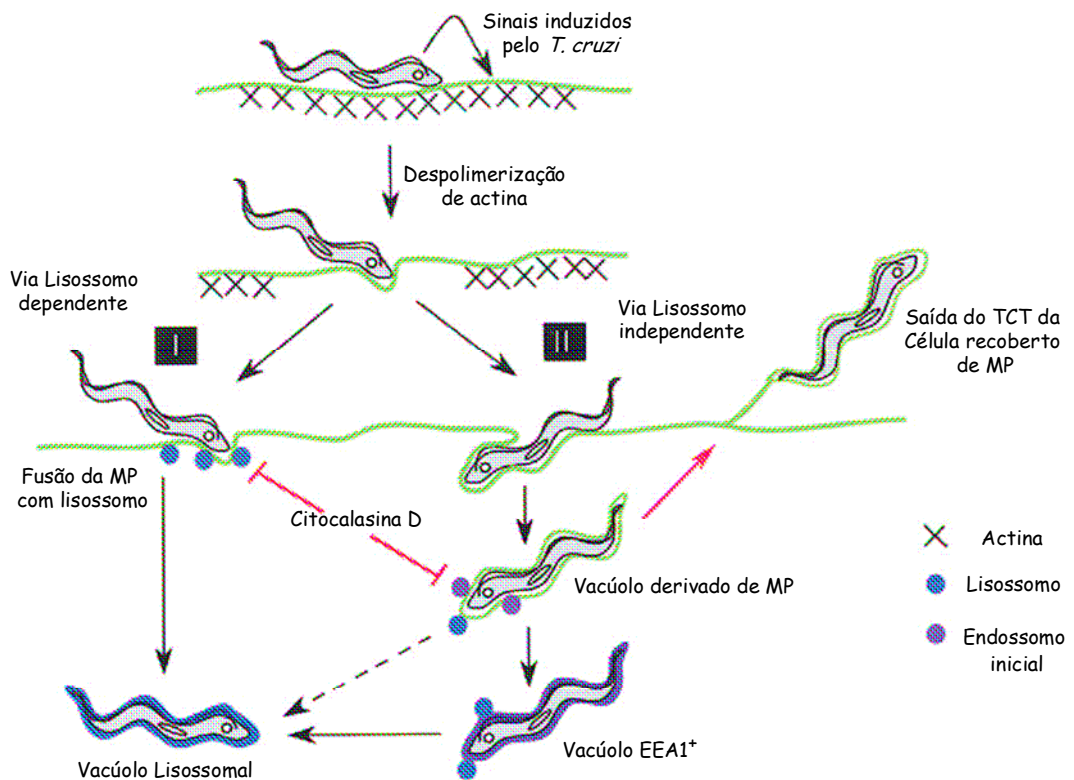
### 1.3.1 – Participação de cinases na invasão celular

O papel da PI3K como regulador da invasão do *T. cruzi* foi demonstrado quando se observou que moléculas de fosfoinositol-3-fosfatos (PIP3) acumulam rapidamente na célula hospedeira em resposta à infecção pelos tripomastigotas, e que a inibição da PI3K bloqueia a entrada do parasita em células fagocíticas e não-fagocíticas (TODOROV *et al.*, 2000; WILKOWSKY *et al.*, 2001). Estudos utilizando proteínas AKT em quimera com GFP revelaram o enriquecimento dessas proteínas na membrana do vacúolo formado pela internalização dos parasitas, juntamente com o rápido acúmulo de PIP3 na membrana celular (WOOLSEY *et al.*, 2003). Observou-se ainda que a AKT translocada para a membrana não co-localiza com os lisossomos durante o processo de invasão (WOOLSEY *et al.*, 2003), sugerindo a existência de dois mecanismos independentes de entrada utilizados pelos parasitas. Os dados ainda sugerem que a PI3K é importante na regulação da invasão dos parasitas tanto na via de entrada dependente de lisossomos quanto da via independente de lisossomos, provavelmente comprometendo a internalização dos tripomastigotas, mas não tendo impacto na capacidade dos tripomastigotas de se associarem aos lisossomos em eventos tardios, após sua entrada na célula. Além disso, acredita-se que uma terceira via de entrada possa existir, na qual ocorreria a associação de endossomas iniciais EEA-1 positivos com o vacúolo parasitóforo, associando-se, tardiamente, aos lisossomos da célula (WOOLSEY *et al.*, 2003).

Estudos posteriores revelaram que a fusão dos lisossomos com o vacúolo parasitóforo é uma etapa essencial para o estabelecimento da infecção produtiva pelos tripomastigotas (ANDRADE e ANDREWS, 2004). Além disso, observou-se que o tratamento prévio das células com citocalasina D promove a despolimerização do citoesqueleto de actina, favorecendo a entrada dos tripomastigotas pela via

independente da fusão de lisossomos com a membrana da célula hospedeira (WOOLSEY e BURLEIGH, 2004; ANDRADE e ANDREWS, 2004) (Esquema 1). Observou-se ainda, que a entrada dos parasitas em células pré-tratadas com inibidores da PI3K ocorre através de invaginações da membrana plasmática, porém esses parasitas saíam da célula hospedeira momentos após a invasão (WOOLSEY e BURLEIGH, 2004). Vale ressaltar que a fusão gradual dos lisossomos com o vacúolo parasitóforo impede o escape do parasita da célula hospedeira nessas condições (ANDRADE e ANDREWS, 2004). No entanto, o comprometimento do citoesqueleto de actina da célula hospedeira não permite que os parasitas internalizados fiquem retidos na célula hospedeira, permitindo que os parasitas escapem (ANDRADE e ANDREWS, 2004).

Esse conjunto de dados indica que a invasão celular pelos tripomastigotas de *T. cruzi* ocorre em duas etapas, entrada e retenção, sendo a primeira mediada por diferentes mecanismos engajados pelos parasitas, enquanto a retenção dos tripomastigotas na célula requer a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos da célula hospedeira (WOOLSEY e BURLEIGH, 2004).



**Esquema 1: Modelo de invasão do *T. cruzi*:** o modelo mostra duas vias alternativas de entrada em células não-fagocíticas. Os tripomastigotas interagem com a superfície da célula hospedeira e ativam vias de sinalização que levam a uma despolimerização transiente dos filamentos de actina. A via dependente de lisossomos é iniciada pela exocitose dos lisossomos para a membrana plasmática (MP), regulada por transientes de cálcio que resultam na entrada de 20% dos tripomastigotas. Na via independente dos lisossomos, os parasitas entram através de invaginações da MP que acumulam PIP3, maior produto da ativação de PI3K. Como resultado, 50% dos parasitas internalizados estão em vacúolos ricos em marcadores da MP e menos de 20% em endossomas iniciais (EEA1) após 10 minutos de infecção. A despolimerização prolongada dos filamentos de actina leva à saída dos parasitas internalizados pela invaginação da MP. Independente da via de entrada do parasita, todos são direcionados e terminam se fusionando aos lisossomos (WOOLSEY e BURLEIGH, 2004).

A participação de proteases no mecanismo de geração de peptídeos controlados por  $[Ca^{+2}]_i$  foi proposta com base em duas linhas de investigação: (i) dependente de uma serino-protease oligopeptidase B (BURLEIGH e ANDREWS, 1995b; BURLEIGH *et al.*, 1997; CALER *et al.*, 1998); (ii) dependente da cruzipaina, capaz de liberar a bradicinina a partir de moléculas de cininogênios adsorvidas na matriz extracelular e/ou superfície de células ativando B<sub>2</sub>R (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000).

### 1.3.2 – Sinalização celular mediada pela oligopeptidase B

O primeiro exemplo de sinalização de cálcio em *T. cruzi* mediado por proteases foi relatado em estudos com a serino-protease oligopeptidase B em tripomastigotas da cepa Y (BURLEIGH e ANDREWS, 1995), tendo como premissa a geração de peptídeos capazes de sinalizar a célula hospedeira através de um receptor acoplado à proteína G (GPCR). A ativação celular mediada pela fosfolipase C induz a geração de inositol 3-fosfato (IP<sub>3</sub>), promovendo a mobilização de cálcio de estoques sensíveis ao tratamento com tapsigargina (RODRIGUEZ *et al.*, 1995). Apesar de ter sido proposto que essa atividade sinalizadora de [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> está associada à atividade da oligopeptidase B do parasita, os autores observam que nem a enzima purificada do parasita ou sua forma recombinante eram capazes de gerar diretamente transientes de cálcio na célula mamífera (BURLEIGH *et al.*, 1997). Uma vez que a oligopeptidase B é uma enzima citoplasmática, foi sugerido que essa enzima atuaria processando um peptídeo no citoplasma do parasita, gerando um agonista que seria secretado para o meio extracelular, promovendo então a sinalização da célula hospedeira (BURLEIGH *et al.*, 1997). Estudos posteriores utilizando tripomastigotas deficientes no gene da oligopeptidase B corroboram a importância dessa enzima no processo de invasão (CALER *et al.*, 1998). Foi observado que esses parasitas mutantes tornaram-se incapazes de invadir eficientemente células mamíferas *in vivo* e *in vitro*. Além disso, a invasão residual desses parasitas demonstrou-se insensível ao pré-tratamento das células com tapsigargina e toxina pertussis, indicando que a oligopeptidase B estaria participando de uma via de sinalização de cálcio mediada por GPCRs (sensível à toxina PTx)/ Ca<sup>+2</sup>-IP<sub>3</sub> (CALER *et al.*, 1998; 2000). Entretanto, foi observado que esses parasitas mutantes mantiveram a capacidade de promover o aumento nos níveis de AMPc na célula hospedeira. Esses dados sugerem a existência de duas vias

independentes de invasão celular pelo tripomastigota de cultura (TCT) Y: a primeira mediada pela oligopeptidase B com aumento dos níveis de cálcio, e uma segunda via independente da participação da oligopeptidase B (insensíveis à toxina PTx) e com aumento nos níveis de AMPc (CALER *et al.*, 2000).

Os GPCRs constituem a maior família de proteínas de superfície celular envolvidos na sinalização através da membrana plasmática. Todos os GPCRs são proteínas com sete passagens pela membrana (revisado por FILIPEK *et al.*, 2003) e podem ser agrupados em seis classes baseado na homologia de sequência e similaridade funcional: Classe A (família do tipo rodopsina); classe B (receptor da família da secretina); classe C (receptor metabotrópico); Classe D (receptor de ferormônio); classe E (receptores de AMPc) e Classe F (Frizzled/Smoothed) (PIERCE *et al.*, 2002; LEFKOWITZ, 2004) . A superfamília dos GPCRs compreende aproximadamente 950 genes no genoma humano, incluindo aproximadamente 500 GPCRs sensoriais (TAKEDA *et al.*, 2002; MIRZADEGAN *et al.*, 2003; FREDRIKSSON *et al.*, 2005) e modulam vários processos fisiológicos. Mutações nos genes que codificam esses receptores têm sido implicadas em muitas doenças (DOGGRELL, 2004; BJENNING *et al.*, 2004; DAHL *et al.*, 2005).

Existem evidências que sugerem que os GPCRs funcionam como dímeros e essa dimerização pode ocorrer entre GPCRs de uma mesma família ou entre famílias distintas. Essa dimerização mostra efeitos sobre a interação com o ligante, ativação do receptor, dessensibilização e tráfego, assim como na sinalização do receptor (revisado por RIOS *et al.*, 2001; revisado por ANGERS *et al.*, 2002; revisado por BOUVIER, 2001; revisado por DEVI, 2001; revisado por MILLIGAN, 2001; revisado por GEORGE *et al.*, 2002).

### 1.3.3 – Envolvimento da cruzipáina nos mecanismos de invasão celular

Historicamente, os estudos sobre o papel da cruzipáina no mecanismo de invasão foram precedidos por estudos realizados por Murta e cols. que identificaram um antígeno de *T. cruzi*, gp57/51, denominada cruzipáina, cuja expressão é finamente regulada durante a morfogênese do *T. cruzi* (MURTA *et al.*, 1990; BONALDO *et al.*, 1991). Essa enzima pertence à família das cisteíno proteases do tipo papaína pertencente ao clã da família C1, (RAWLINGS *et al.*, 1994). A cruzipáina é membro de uma família multigênica polimórfica, sendo codificada por um grande número de genes (~15) arrançados em sequência no genoma do parasita (CAMPTELLA *et al.*, 1992). A cruzipáina possui uma longa extensão C terminal com função desconhecida, que está ausente nas catepsinas lisossomais de mamíferos (ASLUND *et al.*, 1991). É sintetizada na forma de zimogênio e sofre modificações pós-traducionais e processamento proteolítico antes de chegar aos lisossomos (MURTA *et al.*, 1990).

Utilizando inibidores irreversíveis de cisteíno proteases, Meirelles e cols. sugeriram que a atividade enzimática da cruzipáina era necessária para a invasão da célula hospedeira e desenvolvimento intracelular (MEIRELLES *et al.*, 1992). Trabalhos de caracterização cinética e bioquímica revelaram que a cruzipáina possui especificidade de substrato similar à catepsina B e L (CAZZULO *et al.*, 1990; LIMA *et al.*, 1992) de mamíferos. A clonagem, expressão e a resolução da estrutura cristal da cruzipáina possibilitou o desenvolvimento de inibidores mais potentes e mais seletivos. A modificação química de inibidores sintéticos di-peptídicos, previamente testados (fluoromethylcetona), viabilizou a síntese de compostos com maior afinidade pela cruzipáina, maior estabilidade e menos efeitos tóxicos (vinilsulfonas). A administração desses inibidores em doses terapêuticas foi capaz de resgatar camundongos de infecções letais agudas e reduzir a parasitemia em duas unidades logarítmicas (ENGEL *et al.*,

1998). Em conjunto, esses dados validaram a cruzipáina como alvo para o desenvolvimento de drogas (McGRATH *et al.*, 1995; GILLMOR *et al.*, 1997).

A participação da cruzipáina no mecanismo de invasão da célula hospedeira foi relacionada com a sua capacidade de gerar cininas (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Utilizando células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs) e células de ovário de hamster transfectadas com o receptor B<sub>2</sub> de bradicinina (CHO-B<sub>2</sub>R), Scharfstein e cols. demonstraram que a presença do inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) potencializa a entrada dos TCT nessas células, sem alterar a invasão de CHO-mock. Reafirmando a importância da geração de cininas nesse processo, os autores demonstraram que a presença do antagonista de B<sub>2</sub>R e anticorpos monoclonais anti-HK/BK bloquearam esses efeitos, sugerindo que o cininogênio adsorvido na superfície das células serve de substrato para a cruzipáina, liberando as cininas. A incubação de células CHO-B<sub>2</sub>R com cruzipáina purificada promove a geração de transientes intracelulares de [Ca<sup>2+</sup>], sendo essas respostas bloqueadas pela adição de HOE-140, antagonista específico do receptor B<sub>2</sub>R, ou E-64, inibidor reversível de cisteíno-proteases do tipo papaína. Além disso, o pré-tratamento dessas células com bradicinina resultava em aumento da invasão pelos TCT, processo esse bloqueado pelo tratamento com inibidores sintéticos para cruzipáina permeáveis à membrana (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Também foi demonstrado que o MGTA, inibidor da enzima cininase I, diminui seletivamente a infectividade dos TCT em células que expressam B<sub>1</sub>R e que a adição de antagonistas de B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R em células que coexpressam esses receptores inibe a infectividade do parasita nos mesmos níveis (TODOROV *et al.*, 2003). Como a aplicação combinada de ambos os antagonistas não teve efeito aditivo, tanto em cardiomiócitos como em HUVECs, sugerimos que B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R operam interdependentemente na internalização do parasita (TODOROV *et al.*,

2003). Além disso, observou-se que a liberação de cininas a partir de moléculas de cininogênio do hospedeiro através da ação da cruzipaina é, significativamente, aumentada na presença de concentrações ótimas de heparan sulfato (LIMA *et al.*, 2002). Esses conjuntos de dados indicam que a cruzipaina processa cininogênios estabilizados na superfície celular através de interações com proteoglicanos sulfatados, heparan sulfato (LIMA *et al.*, 2002). As cininas, uma vez liberadas pela cruzipaina, estimulam receptores B<sub>2</sub>, induzindo um aumento da taxa de invasão do parasita (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; TODOROV *et al.*, 2003). Cabe frisar, no entanto, que existem níveis residuais de infecção nas culturas (CHO-B<sub>2</sub>R, HUVECs, cardiomiócitos) mantidas na presença de HOE-140 (antagonista de B<sub>2</sub>R) (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000) ou mesmo na presença do antagonista de B<sub>1</sub>R (TODOROV *et al.*, 2003), indicando que a invasão não depende exclusivamente da sinalização mediada por B<sub>1</sub>R/ B<sub>2</sub>R.

Estudos de invasão *in vitro* de células de músculo liso humano (estado de repouso) por TCT Dm28c revelaram uma correlação entre os níveis de cruzipaina secretada e a taxa de invasão (APARÍCIO *et al.*, 2004). Nesse trabalho, foi demonstrado que TCT da cepa G (cepa de baixa infectividade) apresentava níveis reduzidos de cruzipaina ativa em comparação à cepa Dm28c. Entretanto, o produto de secreção (meio condicionado) do TCT cepa Dm28c, rico em cruzipaina, resgatou a infectividade da cepa G, sendo essa invasão abolida na presença do E-64 (inibidor irreversível de CP do tipo papaína), sugerindo que a cruzipaina secretada pelo parasita promove a invasão desse tipo celular. Vale mencionar que a invasão dessas células não foi inibida por antagonistas de receptores de cinina, demonstrando que a cruzipaina participa de múltiplos mecanismos distintos de invasão. O tratamento dos parasitas com o inibidor de cisteína proteases N-Pip-F-Hf-VSP<sub>h</sub> (VS $\phi$ ), mais seletivo para



cruzipaínas, inibe a invasão de HSMCs pelos tripomastigotas das cepas Dm28c, X10/6, mas não da cepa G (APARÍCIO *et al.*, 2004).

Mais recentemente, um potente inibidor de cisteíno-protease (CP), denominado chagasina, foi identificado no *T. cruzi* (MONTEIRO *et al.*, 2001). Localizada na bolsa flagelar e vesículas citoplasmáticas dos TCT, a chagasina tem sua expressão inversamente correlacionada com a cruzipaína durante a metaciclogênese (MONTEIRO *et al.*, 2001). Esse inibidor interage com a cruzipaína formando complexos de alta afinidade e regulando a atividade da enzima. Experimentos utilizando parasitas que super-expressam a chagasina (pChag) como modelo indicam que o aumento da expressão de chagasina interfere no tráfego celular e na maturação da pró-cruzipaína, provocando um aumento da secreção desses precursores para a bolsa flagelar. A superexpressão da chagasina na forma tripomastigota reduz sua infectividade devido à diminuição da ativação da rota de invasão dependente de cruzipaína. Utilizando células de músculo liso humano como modelo, demonstrou-se que a invasão dependente da atividade da cruzipaína envolve ativação (i) de receptores acoplados a proteína G sensíveis a toxina pertussis, (ii) da proteína cinase C $\delta$ , (iii) de aumento nos níveis de AMPc, (iv) modulação negativa pela PI3K. Em conjunto, esses estudos sugerem que a chagasina regula a atividade da cruzipaína durante a morfogênese do *T. cruzi*. Com base nesses estudos, foi proposto que alterações na relação molar enzima:inibidor, modula funções proteolíticas e tem impacto na diferenciação e invasão do parasita em células mamíferas (SANTOS *et al.*, 2005; 2006).

#### **1.3.4 – Mecanismos de invasão dependentes de TGF- $\beta$**

Estudos com a cepa Silvio X10 e Tulahuén em células epiteliais demonstram que a transdução de sinal via receptores de TGF- $\beta$  facilitam a invasão pelo *T. cruzi* (MING *et al.*, 1995; HALL e PEREIRA, 2000). Foi observado que os tripomastigotas

eram incapazes de invadir células deficientes no receptor para TGF- $\beta$ , e que a susceptibilidade à infecção era restaurada quando o receptor era re-expresso na célula mamífera (MING *et al.*, 1995). Sabe-se que o TGF- $\beta$  exerce um papel imunomodulatório importante na infecção aguda e crônica da Doença de Chagas, sendo detectados em altos níveis em lesões cardíacas (ZHANG e TARLETON, 1996), sendo assim, a capacidade do TGF- $\beta$  em regular a invasão do parasita pode ter importantes conseqüências para a patogênese da Doença de Chagas.

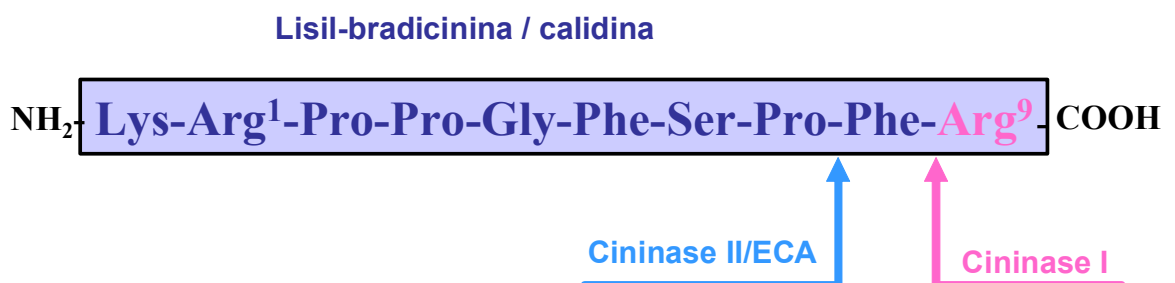
Dados recentes demonstram a capacidade do *T. cruzi* em ativar diretamente o TGF- $\beta$  latente, sendo essa ativação requerida para a entrada do parasita na célula hospedeira (cardiomiócitos) e na modulação da infecção do *T. cruzi*. A ativação do TGF- $\beta$  latente foi observada mesmo em baixas densidades de parasitas, sugerindo que essa ativação ocorre em condições fisiologicamente relevantes. Tanto a cepa Y como a Dm28 são capazes de ativar o TGF- $\beta$  latente demonstrando uma característica conservada entre linhagens distintas (revisado por DEVERA *et al.*, 2003). Como as formas amastigotas e tripomastigotas são capazes de ativar o TGF- $\beta$  latente, os autores sugerem que haja a necessidade do TGF- $\beta$  ativo na diferenciação das formas amastigotas em tripomastigotas no final da fase intracelular do ciclo de vida do parasita, sugerindo que o rompimento das células infectadas resulte na liberação do parasita simultaneamente com a forma ativa do TGF- $\beta$  no microambiente, facilitando então a invasão das células vizinhas (WAGHABI *et al.*, 2005).

#### **1.4 - Sistema Calicreína-Cininas**

As cininas pertencem a um grupo de peptídeos de 9-11 aminoácidos estruturalmente relacionados com o nonapeptídeo bradicinina (BK), e que incluem a lisil-BK (calidina), e seus metabólitos ativos, des-Arg<sup>9</sup>-cininas. Conforme ilustra o

esquema 2, a BK e a calidina são geradas através da clivagem, proteolítica de seus respectivos precursores, o cininogênio de alto peso molecular (HK) e o cininogênio de baixo peso molecular (LK), devido à ação de caliceínas plasmáticas e tissulares respectivamente (revisado por COUTURE *et al.*, 2001). No contexto de infecções, proteases de origem lisossomal, como a cruzipaina, também são capazes de processar o cininogênio liberando cininas (DEL NERY *et al.*, 1997; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000).

Existem duas formas de cininogênio no plasma humano e na maioria das espécies de mamíferos. O cininogênio de alto peso molecular (HK) é formado por uma cadeia de 80-115 kDa, dependendo da espécie de origem, enquanto que o cininogênio de baixo peso molecular (LK) possui peso molecular de 50-68 kDa. As diferentes formas de cininogênio possuem a mesma estrutura básica: na porção amino-terminal uma cadeia pesada de 50-60 kDa ligada a porção carboxi-terminal da cadeia leve de comprimento variável dependendo do segmento cinina. A cadeia leve permite distinguir entre o HK e LK. O HK tem uma única e grande cadeia leve de 48-58 kDa comparada com a cadeia leve do LK de apenas 4-5 kDa. O sítio primário da biosíntese de cininogênio é o fígado, com menor expressão em outros tecidos. A cadeia pesada do LK e HK consiste de três domínios (revisado por BLAIS *et al.*, 2000).



**Esquema 2:** Metabolismo da Lisil-bradicinina (Calidina) pelas Cininases I e II

O domínio 1 possui um sítio de ligação a  $\text{Ca}^{2+}$ . Os domínios 2 e 3 contêm sítios de inibição de cisteíno proteases (por exemplo: catpsina B, H e L); caracterizados pela presença de uma seqüência pentapeptídica Gln-Val-Val-Ala-Gly, com motivo conservado das cistatinas, uma superfamília de inibidores de cisteíno proteases de mamíferos. O domínio 3 contém uma região de ligação celular para plaquetas e células endoteliais, e que inibe a ativação plaquetária induzida por  $\alpha$ -trombina (revisado por BLAIS *et al.*, 2000). Em seguida, o HK e LK apresentam, no domínio 4, uma seqüência de 10 aminoácidos que correspondem a Lisil-BK (calidina). A BK é liberada do HK pela ação da calicreína plasmática, ao passo que a calicreína tissular libera Lisil-BK de HK/LK. Entretanto, ambos os cininogênios são substratos para ambas as formas de calicreínas. Os domínios 5 e 6, presentes somente no HK, estão localizados na extremidade C-terminal e são responsáveis pela sua atividade procoagulante. O domínio 5 é rico em resíduos de histidina, prolina e lisina, e ancora as proteínas às superfícies de carga negativa. O domínio 6 é responsável pela interação do HK com a precalicreína e o fator XI. Além disso, o domínio 6 serve como receptor celular para precalicreína e fator XI em plaquetas, neutrófilos e células endoteliais (revisado por BLAIS *et al.*, 2000). O domínio 5 do LK é único na cadeia leve de 4 kDa, e ainda possui funções desconhecidas.

O sangue circula na vasculatura endotelial sem permitir a ativação descontrolada de cascatas de proteases (por exemplo, sistemas de coagulação, sistema complemento, sistema de cininas), contribuindo assim para homeostase. Lesões no endotélio levam à exposição de colágeno, promovendo a ativação do sistema de coagulação. Nessas circunstâncias, o fator XII, um zimógeno, adere a uma superfície negativamente carregada, sofrendo autoproteólise, gerando o fator XIIa. O HK circula no plasma

complexado com dois substratos (MANDLE *et al.*, 1976; THOMPSON *et al.*, 1977): a precalicreína (PK) e o fator XI. Uma vez clivado, HK adere à superfície negativa (SCOTT *et al.*, 1984), posicionando a PK e o fator XI na superfície, onde o fator XIIa pode clivar a precalicreína em calicreína e o fator XI em fator XIa. O fator XIa pode ativar a via intrínseca de coagulação, enquanto a calicreína libera bradicinina do cininogênio (revisado por BLAIS *et al.*, 2000).

As cininas têm múltiplos efeitos fisiológicos, sendo implicadas na regulação da pressão sanguínea, funções renais e cardíacas. Em situações patológicas, estão implicadas na patogênese da hipertensão e inflamação, e mais recentemente na modulação da resposta imune (TODOROV *et al.*, 2003; ALIBERTI *et al.*, 2003; revisado por SCHARFSTEIN, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2006; SCHARFSTEIN *et al.*, 2007). As cininas são agonistas de meia-vida curta, pois sofrem rápida degradação por proteases peptidases presente em tecidos e nos fluidos biológicos. As metalopeptidases que metabolizam cininas incluem: a enzima conversora de angiotensina (ECA), a endopeptidase neutra (NEP), a carboxipeptidase M (CPM), a carboxipeptidase N (CPN), a aminopeptidase P (APP) e a aminopeptidase N (APN) (revisado por YEPENG e WENFANG, 2007). Todas essas enzimas pertencem à família das zinco-metalopeptidases, e, portanto dependem da presença de zinco no seu sítio catalítico para hidrolisar o substrato. Essas enzimas são glicoproteínas de cadeia única ancoradas na membrana através de âncoras de GPI, ou presentes na forma solúvel, exceto a CPN que é uma glicoproteína tetramérica encontrada apenas na forma solúvel (revisado por BLAIS *et al.*, 2000). A carboxipeptidase N (cininase I) é produzida no fígado e secretada na circulação (PLUMMER e HURWITZ 1978; LEVIN *et al.*, 1982). A cininase I cliva uma variedade de substratos peptídicos protéicos contendo Arg ou Lys no C-terminal, geralmente clivando Lys mais rápido do que Arg. Ao remover a Arg

carboxi-terminal do agonista da BK ou lisil-BK (calidina), a cininase I converte esses peptídeos nos seus metabólitos ativos, as des-Arg-cininas. A carboxipeptidase M (cininase I) está firmemente ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidilinositol (GPI) (DEDDISH *et al.*, 1998).

A endopeptidase neutra (NEP) é uma ectoenzima ligada à membrana através de um peptídeo sinal não clivado localizado no N-terminal (ROY *et al.*, 1993). A NEP tem uma ampla distribuição nos tecidos, mas ao contrário da ECA (Cinase II), tem baixo nível de expressão no endotélio vascular (SIMMONS e ORAWKI, 1992). A NEP é uma dipeptidil-carboxipeptidase que cliva preferencialmente pontes de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Tal como a ECA, ela inativa a BK pela clivagem da ligação Pro<sup>7</sup>-↓Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>. Por sua vez, a ECA é uma proteína integral de membrana com atividade dipeptidil carboxipeptidásica, presente na superfície de uma variedade de tipos celulares. Através da ação de secretases, a ECA, pode ser liberada da superfície da célula, sendo encontrada na forma solúvel no plasma (IGIC *et al.*, 2003). Amplamente distribuída, a ECA é encontrada em abundância no endotélio vascular. Possuindo dois sítios catalíticos, a ECA desempenha diversas funções fisiológicas, entre as quais: (i) inativar a bradicinina; (ii) processar a Angiotensina I, gerando a angiotensina II, um potente hormônio vasopressor (JASPARD *et al.*, 1993).

A aminopeptidase P catalisa a remoção de qualquer aminoácido terminal que esteja adjacente a um penúltimo resíduo de prolina. A APP está ancorada à membrana plasmática via GPI. A forma plasmática da APP é provavelmente liberada da membrana plasmática de células endoteliais através da ação de uma fosfatidilinositol fosfolipase C específica (PI-PLC) (HOOPER *et al.*, 1988; SIMMONS e ORAWSKI, 1992; ORAWSKI e SIMMONS, 1995) ou por uma proteinase. A BK é um excelente substrato para a APP *in vitro*, resultando na perda da atividade biológica da cinina (revisado por

BLAIS *et al.*, 2000). A APN é uma enzima multifuncional, envolvida na tumorigênese, sistema imune e dor. Além disso, funciona como um receptor para o corona vírus e outras viroses humanas. APN também está envolvida com apresentação antigênica. Essas funções facilitam a modulação das respostas de peptídeos bioativos (liberação de vasopressina) e influenciam a funções imunes e alguns eventos biológicos como proliferação celular, invasão e angiogênese (revisado por YEPENG e WENFANG, 2007). Além de cininas, essas enzimas hidrolizam diversos outros oligopeptídeos *in vitro*, incluindo as anafilotoxinas C3a e C5a, endotelinas, substância P, entre outros (revisado por BLAIS *et al.*, 2000).

#### **1.4.1 - Receptores de Cininas**

As cininas estão envolvidas em uma série de efeitos biológicos tais como regulação do tônus de vários tipos de musculatura lisa, regulação da pressão arterial, transporte de glicose e de eletrólitos, estimulação da reabsorção óssea e proliferação celular (BHOOLA, 1992; BASCANDS *et al.*, 2003), sensibilidade à dor (DRAY, 1997) e modulação da resposta imune (TODOROV *et al.*, 2003; ALIBERTI *et al.*, 2003; revisado por SCHARFSTEIN, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2006; SCHARFSTEIN *et al.*, 2007). Além dessas importantes ações fisiológicas, as cininas participam de vários processos patológicos, como câncer, asma, hipertensão, choque séptico, pancreatite e artrite (BHOOLA *et al.*, 1992; CASSIM *et al.*, 2002; BASCANDS *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a administração de bradicinina (BK) sobre a pele lesionada ou intradermicamente em humanos induz dor intensa, sendo uma das substâncias hiperalgênicas endógenas mais potentes. Na periferia, uma das ações mais importantes da BK envolve a estimulação de terminais nervosos nociceptivos e produção de dor e inflamação. A participação de cininas na produção da dor foi confirmada através de

estudos em camundongos deficientes para os receptores de cinina. A deleção do gene de B<sub>2</sub>R em camundongos elimina as ações da BK em tecido musculares lisos e neuronais (BORKOWSKI *et al.*, 1995), além de reduzir a hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina (BOYCE *et al.*, 1996). Por outro lado, a deleção gênica de B<sub>1</sub>R produz anti-nocicepção nesses animais quando analisados em modelos de nocicepção aguda induzida por estímulos térmicos intensos ou por estímulos químicos (PESQUERO *et al.*, 2000).

Os receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> são proteínas transmembrana acopladas a proteína G heterotriméricas (HESS *et al.*, 1994; MENKE *et al.*, 1994). Os receptores B<sub>2</sub> são sensíveis à BK, que é responsável pela maioria de seus efeitos fisiológicos, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, dor (REGOLI, 1987), e ativação de células dendríticas imaturas (ALIBERTI *et al.*, 2003). Em estados inflamatórios (DRAY e PERKINS, 1993) como asma e alergia (RODELL, 1996), as cininas promovem a migração de células do sangue para os tecidos e ativam vários tipos celulares, como por exemplo, fibroblastos, macrófagos e leucócitos (BHOOLA *et al.*, 1992). Os receptores B<sub>2</sub> são expressos constitutivamente na superfície de células endoteliais, músculo liso, células epiteliais, fibroblastos, células neuronais (HALL e MORTON, 1997) e células dendríticas (ALIBERTI *et al.*, 2003) e cardiomiócitos (YAYAMA *et al.*, 2000). Ao contrário, o receptor B<sub>1</sub> tem baixa expressão em tecidos normais, tendo sua expressão aumentada sob condições fisiopatológicas, como injúria, infecção ou inflamação crônica (revisado por MARCEAU, 1997; SIEBECK *et al.*, 1998).

A indução do receptor B<sub>1</sub> por citocinas é controlada por MAP cinases e pelo fator de transcrição nuclear -κB (NF-κB) (LARRIVÉE *et al.*, 1998; NI *et al.*, 1998), sendo dependente da ativação de fosfolipases C e de fosfoinositol (MARCEAU *et al.*,



1998; COUTURE & LINDSAY, 2000). Uma vez ativado por des-Arg-cininas, o receptor B<sub>1</sub> promove angiogênese (EMANUELI *et al.*, 2002) e fibrose através do aumento da síntese de colágeno (GOLDSTEIN e WALL, 1984; NADAR *et al.*, 1996).

A ativação de receptores B<sub>1</sub> em resposta ao seu agonista, a des-Arg-cininas, promove o recrutamento de células inflamatórias, além de gerar alguns dos efeitos atribuídos aos receptores B<sub>2</sub> (MCLEAN *et al.*, 2000). Em situações fisiopatológicas, B<sub>1</sub>R é capaz de amplificar a resposta a injúria de tecidos às cininas (revisado por MARCEAU *et al.*, 1998). O aumento das concentrações de cálcio em células endoteliais resultam na ativação do óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que libera NO. A ação do NO no músculo liso induz relaxamento do tônus vascular, sendo assim responsável pelo efeito hipotensivo das cininas na vasculatura. Além disso, o diacilglicerol (DAG) e o cálcio, sozinhos ou em combinação, ativam diversas isorformas da proteína cinase C (PKC) que atuam em diversas vias de sinalização, incluindo aquelas que controlam a proliferação celular de linhagens leucêmicas humanas (NISHIZUKA, 1992). Além da PLC-β, os receptores de cinina também podem ativar fosfolipase A<sub>2</sub>, fosfolipase D e esfingosina cinase, resultando em um aumento nas concentrações de ácido aracdônico em fibroblastos 3T3 (subsequentemente convertido a prostaglandinas), ácido fosfatídico e esfingosina 1-fosfato (BURCH e AXELROD, 1987; BLAUKAT *et al.*, 2000; BLAUKAT e DIKIC, 2001). As prostaglandinas e esfingosina 1-fosfato, uma vez sintetizadas, podem ativar células pelo modo autócrino ou parácrino mediante ligação a GPCRs específicos. As prostaglandinas contribuem para a formação do edema induzido pela BK, no entanto não se pode excluir a possibilidade do ácido fosfatídico e a esfingosina 1-fosfato também participam nesses mecanismos (revisado por BLAUKAT, 2003).

Quando expostos a excesso de agonistas, os receptores de cininas do subtipo B<sub>2</sub> e B<sub>1</sub> são regulados por mecanismos distintos, resultante do envolvimento em diferentes rotas de tráfego intracelular. Os receptores B<sub>2</sub> são internalizados, sendo redistribuídos em caveolas ou em vesículas não revestidas de clatrina (De WEERD e LEEB-LUNDBERG, 1997; HAASEMANN *et al.*, 1998), antes de serem endocitados. Os receptores B<sub>1</sub> são translocados para as caveolas, sendo esse o seu destino final (OSTROM, 2002).

Essas diferenças se devem ao fato de que as funções dos receptores B<sub>2</sub> estão sujeitas a mecanismos rápidos que envolvem: a ligação e dissociação rápida do ligante, a dessensibilização do receptor e a internalização. Portanto, situações que acarretam em uma longa exposição a BK, a expressão de receptores B<sub>2</sub> na superfície diminui drasticamente (MUNOZ & LEEB-LUNBERG, 1992; MUNOZ *et al.*, 1993; MATHIS *et al.*, 1996; PHAGOO *et al.*, 1999; FAUSSNER *et al.*, 1999; MARCEAU *et al.*, 2001). Em contraste, os receptores B<sub>1</sub> elicitam respostas persistentes e sinalização continuada a des-Arg<sup>9</sup>-cininas, pois estão sujeitas a uma limitada dessensibilização, e uma internalização do receptor com uma taxa de dissociação muito lenta. Além disso, uma longa exposição ao agonista aumenta a expressão de receptores B<sub>1</sub> (MATHIS *et al.*, 1996; AUSTIN *et al.*, 1997; FAUSSNER *et al.*, 1999). Essa alça de retroalimentação crônica é amplificada porque des-Arg<sup>9</sup>-BK acumula nos sítios de inflamação, pelo fato de sua meia-vida de 4 a 12 vezes maior do que a da BK (DÉCARIE *et al.*, 1996; MARCEAU *et al.*, 1998). O aumento da expressão de carboxipeptidase M (cininase I) nos tecidos inflamados, também contribui para o aumento endógeno de agonistas de receptores B<sub>1</sub> durante a inflamação (SCHREMMER-DANNINGER *et al.*, 1998; revisado por COUTURE *et al.*, 2001).

Resultados obtidos em modelos animais sugerem que receptores B<sub>2</sub> estão envolvidos na fase aguda da inflamação e dor, enquanto os receptores B<sub>1</sub> participam na fase crônica da resposta inflamatória (DRAY & PERKINS, 1993; DRAY, 1997).

#### **1.4.2 – Envolvimento do sistema de cininas na fisiopatogenia da Doença de Chagas Experimental**

Em 1997, Del Nery e colaboradores demonstraram que a cruzipaina é capaz de processar cininogênios, liberando cininas (DEL NERY *et al.*, 1997). Em seguida, demonstramos que os tripomastigotas valem-se dessa protease para infectar células do hospedeiro (endotélio ou cardiomiócitos) que expressam B<sub>2</sub>R e/ou B<sub>1</sub>R (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2002; TODOROV *et al.*, 2003; revisto por SCHARFSTEIN, 2003). Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que os efeitos biológicos observados *in vitro* e *in vivo* (aumento de invasão celular e inflamação edematogênica) induzidos pelos parasitas dependem da atividade liberadora de cininas da cruzipaina (DEL NERY *et al.*, 1997; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2002; TODOROV *et al.*, 2003; revisado por SCHARFSTEIN, 2006). Cabe ressaltar, que a inoculação de formas não-infectivas (epimastigotas) em dose igual ao inóculo de tripomastigotas, não foi capaz de induzir respostas edematogênicas mediadas por cininas, mesmo em animais pré-tratados com o inibidor da ECA (captopril). Esse fato foi um tanto surpreendente, já que epimastigotas expressam quantidades abundantes de cruzipaina. Consistente com esse resultado verificou-se que a injeção de cruzipaina purificada na pata de camundongos não foi capaz de induzir edema significativo. Em estudos com *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi* utilizando como modelo a bolsa da bochecha do hamster sugerem que o acúmulo de HK nos sítios de infecção é um pré-requisito para que a cruzipaina possa “liberar” cininas nesse sítio (SVENSJÖ *et*

*al.*, 2006). Mediante a injeção de HK na pata de camundongos TLR2<sup>-/-</sup>, sugere-se que esse acúmulo de HK nos sítios de infecção é dependente da ativação de TLR2 pelo *T. cruzi*, sendo um pré-requisito para que a cruzipaina possa liberar cininas na periferia, ativando DCs imaturas. A integração entre inflamação e resposta imune adaptativa é dependente de B<sub>2</sub>R e TLR2 (MONTEIRO *et al.*, 2006). Nesse trabalho demonstrou-se que o extravasamento inicial de plasma para os tecidos é dependente da ativação de TLR2 pelos tripomastigotas e recrutamento de neutrófilos, enquanto a amplificação da resposta inflamatória e indução da resposta imune adaptativa são dependentes da geração de cininas pela cruzipaina a partir do cininogênio extravasado. Esse trabalho constata que tripomastigotas, mas não epimastigotas, mobilizam o eixo TLR2-B<sub>2</sub>R em um “*cross-talk*” resultante da ação cooperativa entre duas moléculas pró-inflamatórias do patógeno: tGPI-mucina e cruzipaina (MONTEIRO *et al.*, 2006).

### **1.5 – Receptores do tipo Toll na Doença de Chagas**

Os receptores do tipo toll (TLRs) tem um papel crucial na imunidade inata inicial contra patógenos invasores. Esses receptores evolutivamente conservados, homólogos aos genes toll de *Drosophila*, reconhecem motivos estruturais altamente conservados chamados de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Os PAMPs incluem vários componentes da parede celular de bactérias como o lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicano (PGN) e lipopeptídeos, além da flagelina, DNA ricos em motivos de CpG, RNA dupla-fita. O estímulo de TLRs pelos PAMPs inicia uma cascata de sinalização que envolve diversas proteínas intracelulares, levando a transcrição de genes pró-inflamatórios (revisado por AKIRA & TAKEDA, 2004). Treze proteínas do tipo Toll transmembrana humanas e onze murinas já foram identificadas (MEDZHITOV *et al.*, 1997b; ROCK, *et al.*, 1998; TAKEUCHI *et al.*, 1999; DU *et al.*, 2000; CHUANG *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2007).

Os TLRs são proteínas transmembranas caracterizadas por um domínio extracelular rico em leucinas e uma cauda citoplasmática que contem regiões conservadas denominadas domínio toll/ receptor IL-1 (TIR). O domínio rico em leucina está envolvido diretamente no reconhecimento de vários patógenos, enquanto que o domínio TIR é responsável por iniciar a cascata de sinalização intracelular.

Os TLRs são predominantemente expressos em tecidos envolvidos com função imune, como o baço, neutrófilos, assim como aqueles ambientes externos como o pulmão e o trato gastrointestinal (UNDERHILL e OZINSKY, 2002). A localização subcelular de diferentes TLRs é consistente com a localização dos patógenos reconhecidos por esses receptores. Por exemplo, TLR1, TLR2 e TLR4 estão localizados na superfície e são recrutados para os fagossomos após a ligação de seus respectivos ligantes (revisado por AKIRA & TAKEDA, 2004). Os TLR3, TLR7 e TLR9 são respectivamente capazes de reconhecer fita dupla de RNA viral (ALEXOPOULOU *et al.*, 2001), fita simples de RNA viral (HEIL *et al.*, 2004, DIEBOLD *et al.*, 2004) e CpG de DNA de bactérias e vírus (HEMMI *et al.*, 2000). Esses receptores estão envolvidos no reconhecimento de estruturas do tipo ácidos nucleicos, que não são expressos na superfície celular (AHMAD-NEJAD *et al.*, 2002; HEIL, *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que o TLR9 é expresso no retículo endoplasmático, e é recrutado para compartimentos endossomais/lisossomais após o estímulo com DNA contendo CpG (LATZ *et al.*, 2004; revisado por AKIRA & TAKEDA, 2004). O repertório de TLRs é ampliado pelo pareamento com diferentes TLRs. Por exemplo, dímeros de TLR2 com TLR6 são necessários para respostas a PGN (OZINSKY *et al.*, 2000). TLR2 ainda é capaz de formar dímeros com TLR1 sendo importantes para a resposta a lipoproteínas (TAKEUCHI *et al.*, 2001). As sinalizações dos TLRs também são influenciadas pelas várias moléculas adaptadoras e acessórias,

como MD2 e CD14 que formam um complexo com TLR4 para responder ao LPS (MIYAKE, 2003).

A sinalização de TLRs consiste de pelo menos duas vias distintas: uma via MyD88 dependente que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 (revisado por TAKEDA e AKIRA, 2004) e uma via MyD88 independente associada com o estímulo de Interferon-  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e a maturação de células dendríticas (DCs) (HOSHINO, *et al.*, 2002). A via MyD88 dependente pode ser ativada por todos os TLRs, exceto TLR3 (revisado por TAKEDA e AKIRA, 2004). Após a ativação pelo patógeno, os TLRs induzem o recrutamento de MyD88 através de seus domínios TIR que ativam IRAK-1 por fosforilação. IRAK-1 então deixa o complexo MyD88-TLR e associa-se a TRAF-6. Essa associação elicita uma sinalização que ativa NF- $\kappa$ B, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12. Evidências indicam que a atividade de IRAK-1 é negativamente regulada por duas moléculas independentes: Tollip e IRAKM, que podem agir como moderadores da resposta inflamatória mediada por TLR (ZHANG e GHOSH, 2002, KOBAYASHI *et al.*, 2002).

A via MyD88-dependente requer a molécula adaptadora TIRAP/Mal para a sinalização via TLR4 e TLR2 (HORNG *et al.*, 2002). O TLR3 dispara a produção de IFN- $\beta$  em resposta à RNA dupla-fita de modo MyD88-independente, sendo essa ativação mediada pela molécula adaptadora TRIF/TICAM-1 (YAMAMOTO *et al.*, 2002). Outra molécula adaptadora envolvida na ativação da via MyD88-independente é TRAM/TICAM-2 (MIYAKE, 2003), que funciona restritamente na ativação de TLR4 (YAMAMOTO *et al.*, 2003).

O receptor TLR2 é crucial para propagação da resposta inflamatória a componentes de bactérias gram-positivas, peptídeoglicanas (PGN), lipoproteínas (LIEN

*et al.*, 1999; SCHWANDNER *et al.*, 1999; UNDERHILL *et al.*, 1999; YOSHIMURA *et al.*, 1999), sendo predominantemente expresso em células envolvidas na primeira linha de defesa, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e mastócitos (YANG *et al.*, 1998; MUZIO *et al.*, 2000; FLO *et al.*, 2001; VISINTIN *et al.*, 2001 ; MALAVIYA *et al.*, 1996 ; ECHTENACHER *et al.*, 1996). Uma baixa expressão foi observada em células epiteliais e endoteliais humanas (IMLER *et al.*, 2001). Em *T. cruzi* já foram descritos dois ligantes de TLR2, as âncoras de GPI presentes na superfície de tripomastigotas (CAMPOS *et al.*, 2001) e a proteína Tc52 liberada pelo parasita (OUASSI *et al.*, 2002). Recentemente foi demonstrado que a injeção de GIPLs no peritônio de camundongos induz o recrutamento de neutrófilos de modo TLR4 dependente (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstraram que a produção de citocinas pró-inflamatórias durante a infecção é fortemente diminuída em camundongos deficientes para a molécula adaptadora MyD88, além disso, esses animais são mais susceptíveis a infecção com *T. cruzi*, sugerindo o envolvimento de TLRs e/ou receptores que dependam do envolvimento dessa molécula adaptadora na resposta imune inata do hospedeiro contra o parasita (CAMPOS *et al.*, 2004). Entretanto, a infecção experimental de camundongos com deleção no gene TLR2 não apresenta diferenças na parasitemia e mortalidade quando comparados aos animais selvagens (CAMPOS *et al.*, 2004). Estudos com camundongos TLR4 mutantes não responsivos, C3H/HeJ, revelaram que o controle da replicação do *T. cruzi* nos estágios iniciais da infecção é prejudicado promovendo uma mortalidade precoce em relação aos camundongos selvagens (C3H/HeN)(OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Durante a fase aguda ocorre a produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de componentes da imunidade inata, como células NK e macrófagos

(ORTIZ-ORTIZ *et al.*, 1976), assim como a ativação policlonal de células T (MINOPRIO *et al.*, 1986). Diferentes estudos indicam um papel crucial das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  (TORRICO *et al.*, 1991), TNF- $\alpha$  (SILVA *et al.*, 1995), IL-12 (ALIBERTI *et al.*, 1996), assim como óxido nítrico (NO) (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994) na resistência do hospedeiro à infecção.

O mecanismo preciso dessa ativação inicial é pouco entendido, no entanto alguns estudos têm identificado moléculas do parasita que são capazes de estimular componentes celulares da imunidade inata. Dentre eles, podemos citar as moléculas de superfície do parasita, como as âncoras livres de glicosilfosfatidilinositol (GIPLs) e diferentes membros de duas principais famílias de glicoproteínas ancoradas por GPI, as mucinas (GPI-mucinas) e as trans-sialidades (TS). Enquanto que nas GPI-mucinas, a propriedade pró-inflamatória reside nas âncoras de GPI (CAMARGO *et al.*, 1997a; 1997b), a atividade pró-inflamatória da TS reside na porção protéica da molécula (SAAVEDRA *et al.*, 1999; TODESCHINI *et al.*, 2002). As âncoras de GPI são potentes ativadores de TLR2 de macrófagos, sendo capaz de induzir grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO (ALMEIDA *et al.*, 2000). A TS possui ainda a capacidade de estimular macrófagos murinos (GAO e PEREIRA, 2001) e monócitos humanos (SAAVEDRA *et al.*, 1999) a produzir IL-6. A proteína Tc52 liberada pelo parasita, também é capaz de estimular macrófagos via TLR2 (FERNANDEZ-GOMEZ *et al.*, 1998).

### **1.5.1 - Super família de glicoproteínas do tipo mucina do *T. cruzi***

A superfície de muitos protozoários parasita, incluindo o *T. cruzi* (SCHENKMAN *et al.*, 1993; PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000) são recobertos por mucinas. Atuando na interface entre o parasita e tanto o vetor como o hospedeiro



infectado, essas moléculas são ideais para dois propósitos: (i) conferir proteção contra o vetor e/ou contra os mecanismos de defesa do hospedeiro-vertebrado e (ii) garantir o direcionamento e invasão em células e tecidos específicos (revisado por BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

Os principais componentes da superfície desses protozoários parasitas são ancorados na bicamada externa da membrana plasmática por GPI. A superfície de diferentes estágios do *Trypanosoma cruzi* é coberta com uma capa de glicoconjugados do tipo mucinas, os quais são altamente glicosilados e estão ancorados à membrana plasmática do parasita através de um motivo de GPI (SCHENKMAN *et al.*, 1993; ALMEIDA *et al.*, 1994; PREVIATO *et al.*, 1994).

Outras glicoproteínas também estão presentes na superfície do parasita em menor número. O mais relevante e importante para a biologia do parasita são as trans-sialidases (TS) (revisado por BUSCAGLIA *et al.*, 2006).

Os ácidos siálicos e as sialidases possuem um papel importante nas interações celulares e modulam o reconhecimento de patógenos pelas células hospedeiras. Ao romperem as células do hospedeiro mamífero, os tripomastigotas possuem pouco ou nenhum ácido siálico na sua superfície. No entanto, ao entrarem na circulação, passam a expressar em sua superfície a trans-sialidase. Essa enzima transfere ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas aceptoras presentes na membrana plasmática do parasita (SCHENKMAN *et al.*, 1991).

Uma característica importante dessas mucinas é que elas são as maiores aceptoras de ácido siálico através da atividade da TS. O ácido siálico é transferido a O-glicanas e a sialilação da superfície do parasita ocorre nas formas tripomastigota e epimastigota, mas não na forma amastigota, uma vez que não possui atividade de trans-sialidase (FREVERT *et al.*, 1992).

Os dois principais glicoconjugados sintetizados por *T. cruzi* são as âncoras livres (GIPLs) e as glicoproteínas do tipo mucina ancoradas por GPI (GPI-mucinas). Os GIPLs são abundantemente expressos nas formas epimastigotas (eGIPLs), mas são encontrados em menor quantidade nas formas tripomastigotas sanguíneas (tGIPLs) (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000). Entre as propriedades biológicas desses glicoconjugados derivados do parasita estão a sua capacidade de elicitar a síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, geração de intermediários reativos de nitrogênio (ex. NO), assim como a expressão de moléculas de adesão por macrófagos e células endoteliais (revisado por ALMEIDA e GAZZINELLI, 2001).

As mucinas ancoradas por GPI purificadas das formas tripomastigotas (tGPI-mucinas), mas não das formas epimastigotas ou metacíclicas (eGPI e mGPI mucinas, respectivamente), elicitam resposta pró-inflamatória (ex. citocinas e produção de óxido nítrico) por macrófagos murinos tratados com IFN- $\gamma$ . (CAMARGO *et al.*, 1997 a,b). Sugerindo que no hospedeiro mamífero, as GPI mucinas e GIPLs estão envolvidas nos processos de reconhecimento e invasão da célula hospedeira, indução e regulação de respostas imune celular e humoral (ROPERT e GAZZINELLI, 2000). Atribui-se à potente atividade pró-inflamatória da tGPI a presença de um ácido graxo insaturado na posição *sn-2* do componente alquilacilglicerolípido (CAMPOS *et al.*, 2001).

Conforme mencionado anteriormente, trabalhos recentes do nosso grupo demonstraram que a inflamação edematogênica desencadeada pelos TCT é mediada pela cruzipaína (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; TODOROV *et al.*, 2003). Uma pista importante para elucidar o papel dos TLRs nesse processo foi que epimastigotas não induziram inflamação mesmo na presença de inibidores da ECA, apesar de possuírem grandes quantidades de cruzipaína. Desta forma, o papel das tGPI-mucinas no mecanismo de ativação do sistema de cininas por TCT pode ser explicado, tendo em

vista que as âncoras (i) foram caracterizadas como um PAMP ligante de TLR2 (CAMPOS *et al.*, 2001), (ii) induzem a ativação de macrófagos (produção de TNF- $\alpha$ , IL-12 e NO) (ALMEIDA *et al.*, 2000) e (iii) recrutam polimorfonucleares (PMNs) por vias dependentes de MCP-1 através da sinalização de TLR2 (COELHO *et al.*, 2002). Observa-se que os tripomastigotas não ativam a via de cinina eficientemente em camundongos TLR2<sup>-/-</sup>, nem mesmo naqueles pré-tratados com inibidor da ECA (MONTEIRO *et al.*, 2006). Utilizando o modelo de microscopia intravital, verificou-se que os tripomastigotas (mas não os epimastigotas) promovem o rápido aporte de proteínas plasmáticas para os tecidos periféricos, controlando assim a geração de cininas pela cruzipaína, um processo relativamente tardio no mecanismo de ativação do sistema de cininas. Com base nesses dados, foi elaborado um modelo no qual o influxo de plasma induzido por neutrófilos depende da resposta iniciada por tripomastigotas via ligantes de TLR2 (tGPI-mucinas) enquanto que as respostas mais tardias (dependente da cruzipaína), geram cininas. Coerente com essa hipótese, a injeção combinada de cruzipaína com tGPI-mucina induziu uma resposta inflamatória em camundongos tratados com o inibidor da ECA através da ativação de B<sub>2</sub>R, mimetizando o fenótipo pró-inflamatório dos tripomastigotas. Controles com as âncoras isoladas de epimastigotas não são capazes de cooperar com a atividade da cruzipaína nas mesmas condições (MONTEIRO *et al.*, 2006). Embora não seja possível excluir que outros ligantes de TLR2, (ex. Tc52) (OUAISSI *et al.*, 2002) participem do mecanismo de inflamação induzido por TCT *in vivo*, esse trabalho constatou que os tripomastigotas mobilizam o eixo TLR2-B<sub>2</sub>R em uma interação cruzada resultante da ação cooperativa entre duas moléculas pró-inflamatórias do patógeno: tGPI-mucina e cruzipaína (MONTEIRO *et al.*, 2006). Consistente com o papel inicial para TLR2 (ativação e/ou recrutamento de neutrófilos) (COELHO *et al.*, 2002), foi demonstrado que os

tripomastigotas não são capazes de induzir reação edematogênica em camundongos previamente depletados de PMNs (MONTEIRO *et al.*, 2006).

### **1.6 - Alterações da Microcirculação na Doença de Chagas**

Trabalhos realizados durante a fase aguda relatam que as alterações microvasculares manifestam-se através de microespasmos (FACTOR *et al.*, 1985), microtrombos (ROSSI *et al.*, 1984), disfunção das células endoteliais e aumento da atividade plaquetária (MORRIS *et al.*, 1990; ROSSI *et al.*, 1992). Na cardiomiopatia chagásica crônica, observa-se uma severa dilatação das artérias associada com tortuosidade dos microvasos, o que pode causar um desequilíbrio na distribuição do fluxo sanguíneo, comprometida perfusão tecidual em algumas áreas causando múltiplos infartos. Por outro lado, as áreas de fibrose podem causar obstrução na trajetória do vaso, favorecendo um desvio do fluxo sanguíneo e o aparecimento de lesões isquêmicas (HIGUCHI *et al.*, 1999). A dilatação da microcirculação pode ser secundária a alteração do fluxo sanguíneo causado por uma fibrose difusa e uma conseqüente desestruturação do vaso. Entretanto, outros mecanismos como denervação (KOBBERLE *et al.*, 1974; GALLO *et al.*, 1987), disfunção endotelial ou liberação de NO é induzida pelo parasita (que também pode estar envolvido na dilatação da artéria). A presença de antígenos do *T. cruzi* tem sido demonstrada na fase tardia da Doença de Chagas (HIGUCHI *et al.*, 1993) e está relacionada com a persistência do infiltrado inflamatório. Alguns autores postulam que o infiltrado inflamatório contribui para a fibrose e dilatação das artérias (HIGUCHI *et al.*, 1999).

A persistência do parasita (TARLETON, 2001), autoimunidade (LEON e ENGMAN, 2003) e comprometimento vascular (TANOWITZ *et al.*, 1996) são fatores que, possivelmente contribuem para a etiologia da cardiomiopatia chagásica. Estudos

em indivíduos com Doença de Chagas e animais experimentais tem demonstrado que a injúria ao endotélio vascular está associada com um aumento dos marcadores inflamatórios (TANOWITZ *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 1999; MUKHERJEE *et al.*, 2004), vasoespasmos, e redução no fluxo sanguíneo (TANOWITZ *et al.*, 1996).

### **1.6.1 - Papel dos Receptores de Endotelina na Doença de Chagas**

A endotelina-1 (ET-1) é o mais potente vasoconstrictor conhecido. Sintetizado por uma variedade de tipos celulares tem sido associada à inflamação, vasoespasmos, danos vasculares e remodelamento cardiovascular. (GUARDA *et al.*, 1993, MULDER *et al.*, 1997; KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001) Reconhecida por receptores acoplados a proteína G-regulatória, a ET-1 induz a ativação de vias de sinalização celular, seja mobilização de cálcio, ativação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), MAPK (ERK1/2) e ciclinas D1 (MORRIS *et al.*, 1988; HUANG *et al.*, 1999; SUZUKI *et al.*, 1999; KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001). Todas essas vias são cruciais no desenvolvimento de disfunções cardiovasculares. Dados publicados implicaram a ET-1 na vasculopatia associada com a infecção pelo *T. cruzi* (WITTNER *et al.*, 1995; TANOWITZ *et al.*, 1999; MUKHERJEE *et al.*, 2003; MUKHERJEE *et al.*, 2004; CAMARGOS *et al.*, 2004).

A endotelina é produzida a partir de um precursor chamado pré-proendotelina (212aa). Após a remoção do peptídeo sinal, a proendotelina é seletivamente processada por uma enzima do tipo furina que gera um precursor inativo denominado big-endotelina (big-ET). A big-ET (38aa) é então clivada e convertida a sua forma ativa, endotelina (ET), por uma metalopeptidase conversora de endotelina (ECE) (YANAGISAWA *et al.*, 1988; PARISSOS *et al.*, 2001), conforme ilustrado no esquema 3A e 3B.

A ECE é uma proteína integral de membrana do tipo II responsável pelo processamento da Big-ET em ET. Existem duas isoformas de ECE: (i) a ECE-1, encontrada em uma variedade de tipos celulares incluindo células endoteliais com atividade ótima em pH neutro, sendo capaz de processar a Big-ET tanto intracelularmente quanto na superfície da célula. (ii) a ECE-2 está distribuída intracelularmente, sendo ativada em condições ácidas (pH 5.8) (EMOTO e YANAGISAWA, 1995; TURNER *et al.*, 1998).

Foram descritas quatro isoformas de ECE-1 em humanos derivadas de um único gene através de splicing diferencial (CODER, 2001) denominadas ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c, ECE-1d (CODER, 2001; BATTISTINI e JENG, 2001). A cauda citoplasmática é responsável pela localização intracelular da enzima, por exemplo, a ECE-1a e ECE-1c estão localizadas na membrana plasmática (VALDENAIRE *et al.*, 1995; SHIMADA *et al.*, 1995), enquanto ECE-1b e ECE-1d possui localização em endossomos tardios (SCHWEIZER *et al.*, 1997) e de reciclagem (MULLER *et al.*, 2003) respectivamente.

A endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo composto de 21 aminoácidos com C-terminal hidrofóbico e duas pontes de cisteína no N-terminal (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Estudos subsequentes identificaram isômeros de endotelina entre as quais endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). A ET-2 é muito similar a ET-1, enquanto a ET-3 difere da ET-1 em 6 dos 21 aminoácidos. Esses isômeros são codificados por 3 genes independentes. Eles diferem na sua estrutura química e potência nos efeitos de contratilidade muscular (INOUE *et al.*, 1989). *In vivo* a principal fonte de ET-1 são as células endoteliais (KISANUKI *et al.*, 1999). A ET-2 é produzida por células do epitélio intestinal enquanto a ET-3 é detectada em neurônios cerebrais, células epiteliais

túbulo-renais e células epiteliais intestinais (MATSUMOTO *et al.*, 1989; BAYNASH *et al.*, 1997).

Entre os fatores que estimulam a produção de ET pelas células endoteliais incluem: (i) estimulação mecânica do endotélio; (ii) IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6; (iii) fatores de crescimento, endotoxinas; (iv) lipídios (LDL, HDL), estresse. E as substâncias que inibem sua síntese são NO, GMPc, prostaciclina (revisado por GORACA, 2002).

Os níveis de ET-1, ET-2 e ET-3 e big-ET no sangue de humanos e animais variam de 0.3 a 3 pg/ml. No entanto, as concentrações de ET nos fluidos corporais, especialmente no tecido, por exemplo, saliva, leite, urina e fluido cerebrospinal são muito maiores que a concentração plasmática (DONCKIER *et al.*, 1991).

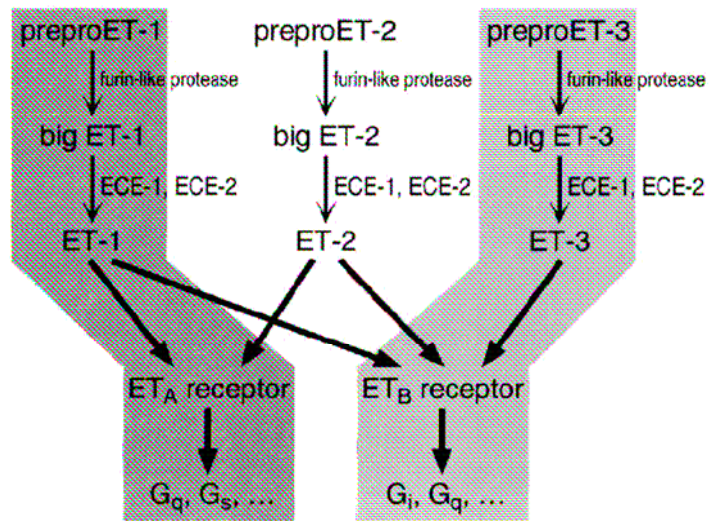
Os efeitos biológicos da endotelina (ET-1, ET-2 e ET-3) são mediados por dois subtipos de receptores acoplados a proteína G-regulatória, ETaR e ETbR (ARAI *et al.*, 1990; SAKURAI *et al.*, 1990). As endotelinas apresentam diferentes afinidades para os diferentes subtipos de receptores. Os receptores ETa são expressos principalmente em células de músculo liso, cardiomiócitos, hepatócitos, adipócitos e respondem com igual afinidade a ET-1 e ET-2 (SEO *et al.*, 1994). O receptor do subtipo ETb é expresso por células endoteliais, músculo liso, cardiomiócitos e responde com igual afinidade a ET-1, ET-2 e ET-3 (ENDO *et al.*, 1998)

Apesar das células endoteliais serem a principal fonte de ET-1, essas também são sintetizadas por outros tipos celulares incluindo cardiomiócitos, músculo liso vascular, macrófagos (MIYAUCHI *et al.*, 1999; NAICKER *et al.*, 2001) e fibroblastos cardíacos (CHENG *et al.*, 2003). A ET-1 interage com o receptor ETa no músculo liso causando aumento dos níveis intracelulares de cálcio, levando a vasoconstrição, e também é capaz de interagir com o receptor ETb no endotélio, causando vasodilatação.

Entretanto os ETbR também podem contribuir para vasoconstricção em alguns vasos sanguíneos (por exemplo, vasculatura mesentérica e coronariana) A importância dos receptores de endotelina nos tecidos vasculares diferem entre as espécies e entre os leitos vasculares dentro de um mesmo animal. Por exemplo, a vasoconstricção renal induzida pela endotelina é mediada por uma população mixta de receptores ETaR e ETbR em ratos (WARNER *et al.*, 1993), mas mediada principalmente por ETaR em cachorros (BROOKS *et al.*, 1994) e humanos (DAVENPORT *et al.*, 1995). O diversificado padrão de expressão de componentes moleculares é ainda mais complicado pela complexa farmacologia e às vezes neutralização das ações fisiológicas. Um exemplo clássico são os vasos, onde a ET-1 derivada do endotélio leva à constricção via ETaR em células musculares e à dilatação via ETbR no endotélio, o que demonstra a importância desses peptídeos na homeostase vascular.

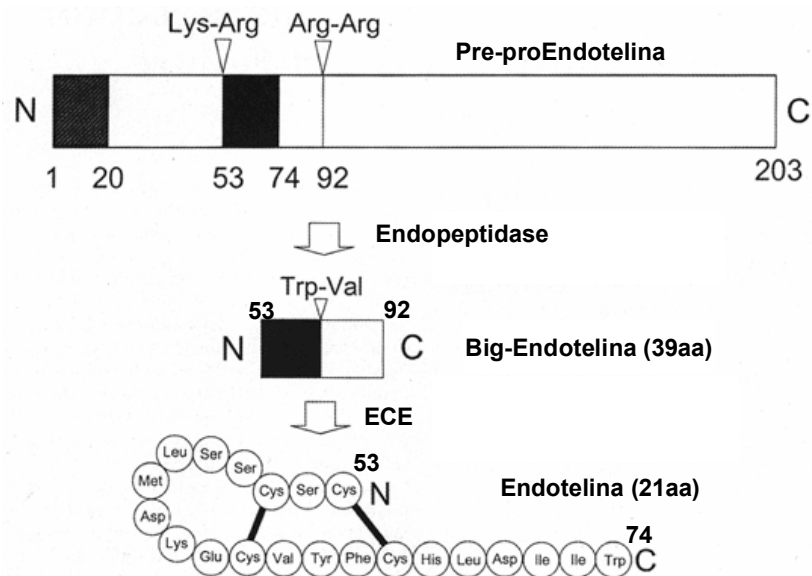
Danos às células endoteliais elevam os níveis de ET-1 (GOTO, 2001; KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001), tendo sido associada à vasoespasmos, danos vasculares, remodelamento e inflamação cardiovascular (GUARDA *et al.*, 1993, KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001, MULDER *et al.*, 1997) e na Doença de Chagas experimental (TANOWITZ *et al.*, 2005).





(Kedzierski e Yanagisawa, 2001)

**Esquema 3A:** Biosíntese da endotelina. Pré-proendotelinas são processadas por uma protease do tipo furina a sua forma intermediária Big-endotelina, que é então clivada a três peptídeos ativos – endotelina através das enzimas conversoras de endotelina (ECE). Estes peptídeos interagem com seus receptores seletivos ET<sub>A</sub>R e ET<sub>B</sub>R. Esses receptores estão acoplados a proteínas G e produzem respostas fisiológicas distintas.



(Adaptado de Barry H, 2002)

**Esquema 3B:** Preproendotelina é sintetizada contendo 212 aminoácidos. Essa molécula é hidrolisada por endopeptidases específicas para lisina-arginina (Lys-Arg), formando a big ET-1 (39 amino acids). Finalmente, a enzima conversora de endotelina (ECE) cliva a Big-ET-1 na ligação triptofano-valina (Trp-Val), liberando a ET (21 aminoácidos).

### 1.6.2 - Papel da Endotelina na infecção Chagásica Experimental

Camundongos infectados com *T. cruzi* apresentam níveis aumentados de ET-1 no plasma e este efeito está atrelado ao aumento dos níveis de RNAm da preproET-1, ET-1 e ECE (PETKOVA *et al.*, 2000; 2001). Além disso, análises de imunohistoquímica revelaram um aumento nos níveis de ET-1 na vasculatura e nas células de miocárdio infectadas com *T. cruzi* (PETKOVA *et al.*, 2000). Foi demonstrado ainda que indivíduos com cardiomiopatia chagásica crônica apresentam níveis elevados de ET-1 no plasma (SALOMONE, *et al.* 2001). Interessantemente, o tratamento dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* com phosphoramidon melhora a patologia e reduz o remodelamento cardíaco (JELICKS *et al.*, 2002).

O possível papel da ET-1 na patogênese da cardiomiopatia chagásica foi estudado em camundongos nocautes para ET-1 (SHOHET *et al.*, 2004; KISANUKI *et al.*, 2001) infectados com *T. cruzi* (cepa Brazil). Análises realizadas na fase aguda mostraram que camundongos ET-1<sup>-/-</sup> apresentam melhora no remodelamento cardíaco determinado por diferentes técnicas que incluem a histopatologia, ecocardiograma e ressonância magnética (MRI) (SHOHET *et al.*, 2004).

A infecção de culturas de células endoteliais pelo *T. cruzi* (cepa Tulahuén) induz a ativação de NF-κB, estimulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias, expressão de moléculas de adesão vascular (HUANG *et al.*, 1999), aumento da síntese de ET-1 (WITTNER *et al.*, 1995) e ativação de ERK e AP-1 (MUKHERJEE *et al.*, 2004). Estas e outras perturbações associadas à infecção na célula endotelial podem contribuir para a patologia focal e vasoespasmos observados em camundongos infectados (MORRIS *et al.*, 1988 e 1989 e 1992). A ET-1 também pode contribuir para deposição de colágeno e

subseqüente fibrose do miocárdio (GUARDA *et al.*, 1993; RAMIRES *et al.*, 2003; MUKHERJEE *et al.*, 2004).

Petersen e Burleigh sugerem que a hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pelo *T. cruzi in vitro* é mediada pela citocina IL-1 $\beta$  (PETERSEN E BURLEIGH, 2003). Estudos anteriores demonstraram que as infecções de células endoteliais pelo *T. cruzi* resultam no aumento dos níveis de RNAm e proteína de IL-1 $\beta$  (TANOWITZ *et al.*, 1992). Sabe-se também que a infecção do endotélio e do miocárdio provoca aumento da síntese de ET-1 e de citocinas (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) (CHANDRASEKA *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 1999; PETKOVA *et al.*, 2001; CHANDRA *et al.*, 2002). Apesar da IL-1 $\beta$  ter um papel importante como um fator inicial na hipertrofia do miocárdio *in vitro* (PETERSEN E BURLEIGH 2003), a ET-1 parece ser importante em uma fase mais tardia da infecção em camundongos (TANOWITZ *et al.*, 2005). É possível que o vasoespasmo induzido pela ET-1 contribui para isquemia focal do miocárdio, levando a uma mionecrose, que por consequência aumenta a síntese de ET-1. Esse ciclo de retroalimentação positiva pode contribuir para o desenvolvimento de hipertrofia do miocárdio e aumento da fibrose. Dados recentes implicam claramente a ET-1 no processo de remodelamento cardíaco (RAMIRES *et al.*, 2003).

## 2- Justificativa

O interesse em estudar os mecanismos de invasão e a participação dos receptores de cininas surgiu quando nosso grupo demonstrou que a cruzipaína processa cininogênios adsorvidos na superfície celular através de interações com heparan sulfato (LIMA *et al.*, 2002). As cininas, uma vez liberadas pela cruzipaína, estimulam receptores B<sub>2</sub>, induzindo um aumento da taxa de invasão do parasita (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; TODOROV *et al.*, 2003). Porém, existem níveis residuais de infecção nas culturas (CHO-B<sub>2</sub>R, HUVECs, cardiomiócitos) mantidas na presença de HOE-140 (antagonista de B<sub>2</sub>R) (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000) ou mesmo na presença do antagonista de B<sub>1</sub>R (TODOROV *et al.*, 2003), indicando que a invasão não depende exclusivamente da sinalização mediada por B<sub>1</sub>R/ B<sub>2</sub>R.

Estudos de invasão *in vitro* em células de músculo liso humano (estado de repouso) por TCT Dm28c revelaram uma correlação entre os níveis de cruzipaína secretada e a taxa de invasão (APARÍCIO *et al.*, 2004). Nesse trabalho, foi demonstrado que uma cepa de baixa infectividade (cepa G) apresentava níveis reduzidos de cruzipaína ativa em comparação à cepa Dm28c. Entretanto, o produto de secreção do TCT Dm28c foi capaz de resgatar a infectividade da cepa G, sugerindo que a cruzipaína secretada pelo parasita promove a invasão desse tipo celular. Vale mencionar que a invasão dessas células não foi inibida por antagonistas de receptores de cinina, demonstrando que a cruzipaína participa de múltiplos mecanismos distintos de invasão (APARÍCIO *et al.*, 2004).

Dados *in vivo* demonstram que a resposta edematogênica do *T. cruzi* depende de efeitos cooperativos entre TLR2, B<sub>2</sub>R (MONTEIRO *et al.*, 2006) e C5aR (SCHMITZ *et al.*, em preparação). Motivados por esses estudos, resolvemos investigar outras vias de

sinalização, independentes de cininas, ativadas pelo parasita e a relação funcional entre os GPCRs (ETRs, BKRs, C5aR) e TLRs no mecanismo de invasão.

Trabalhos publicados recentemente indicam que a invasão celular pelos tripomastigotas de *T. cruzi* envolve pelo menos dois mecanismos distintos: (i) fusão de lisossomos com a membrana plasmática; (ii) formação de invaginação da membrana plasmática (WOOLSEY e BURLEIGH, 2004). Dados obtidos por Camila Chaves em sua tese de doutorado demonstram a participação do  $[Ca^{+2}]_i$ , ativação de PI3K e polimerização do citoesqueleto de actina para a retenção do TCT Dm28c em HSMCs em repouso (SANTOS *et al.*, em preparação). Tendo em vista que os receptores envolvidos nesse processo ainda não são conhecidos, fomos investigar qual o papel de cada um (GPCRs e TLR) nessas diferentes etapas.

Outro aspecto abordado nessa tese são os mecanismos de invasão celular durante o processo inflamatório, que pode ter um efeito dual. Além de ser capaz de estimular o sistema imune, pode favorecer o parasitismo, utilizando-se do sistema de cininas, por exemplo, para invadir a célula hospedeira. Esse processo pode ser de fundamental importância na infecção onde B<sub>1</sub>R está presente. É possível que o estímulo persistente do receptor B<sub>1</sub> possa provocar fibrose (NADAR *et al.*, 1996), contribuindo para a indução de isquemia e provocar alterações de microcirculação, tais como aquelas observadas em pacientes cardiopatas crônicos (HIGUCHI *et al.*, 1999). Decidimos, então, investigar a importância da ativação dos receptores B<sub>1</sub>R para a patogênese da Doença de Chagas.

### **3- Objetivo Geral**

Investigar as relações funcionais entre GPCRs e TLRs nos mecanismos de invasão de células não-fagocíticas pelo *Trypanosoma cruzi*

#### **3.1 - Objetivos Específicos**

- Caracterizar os subconjuntos de receptores envolvidos na invasão de células não-fagocíticas (“repouso” versus “ativadas”), definindo as principais vias de sinalização intracelular mobilizadas em cada um destes sistemas.
- Investigar o papel diferencial dos diversos GPCRs e TLRs nas etapas de entrada versus retenção dos parasitas na célula hospedeira (“repouso” versus “ativada”).
- Investigar as possíveis implicações fisiopatológicas da indução do receptor B<sub>1</sub> de cininas pelos tripomastigotas

## **4 - Materiais e Métodos**

### **4.1 - Parasitas**

Tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) das cepas Dm28c e Colombiana de *T. cruzi* foram obtidos de sobrenadantes de 4-5 dias de culturas de LLCMK<sub>2</sub> infectadas na proporção 1:1 (parasita:célula hospedeira) mantidas em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM - Sigma) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB - GIBCO) (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Cepas de *T. cruzi* utilizados: Dm28c, Colombiana. Os epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivados a 28°C em meio LIT (Sigma) contendo 10% SFB. Os parasitas foram então lavados por 3x em HBSS antes de serem utilizados nos experimentos.

### **4.2 - Células**

Células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs) (gentilmente cedidas pela Dra. Verônica Morandi) foram obtidas através do tratamento de cordões umbilicais com 0.1% (p/vol) de solução de colagenase IV (Sigma). Culturas primárias de HUVECs foram plaqueadas a densidade de 10<sup>5</sup>/mL em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, Big Flats, NY) cobertas com 2% de gelatina (Sigma) e crescidas em meio M199 (Sigma) suplementado com 2 mM de glutamina (Sigma), 25 µg/ml de amphotericina B (Sigma), 100 µg/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ml de gentamicina (Sigma), 0.13% de bicarbonato de sódio (Sigma), e 20% de SFB. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência. Após o tratamento com 0.02% de tripsina/0.02% de EDTA (Sigma), as HUVECs foram plaqueadas em placas de 24 poços com lamínulas cobertas com gelatina e cultivadas em M199-SFB (20%) a 37°C por 48 horas antes do experimento.

Os corações de camundongos (suíços) foram removidos assepticamente: o átrio foi removido, e os ventrículos cortados em pequenos fragmentos. Esses fragmentos foram lavados para retirar as células sanguíneas e incubados 3 ou 4 vezes por 10 min com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  em solução livre de outros sais, contendo 0.05% de tripsina (Difco, Detroit, MI) e 0.01% de colagenase (tipo II; Worthington, Lakewood, NJ) a 37°C. A atividade enzimática foi interrompida com 10% de SFB. Após centrifugação da suspensão a baixa rotação, o pellet de células foi ressuspensão em DMEM com 20% SFB, 2% de extrato de embrião de pinto (SIGMA), 1mM glutamina, 1000 U/ml penicilina, e 50 µg/ml estreptomicina. A suspensão celular foi depletada de fibroblastos através do plaqueamento prévio das células em garrafas de culturas cobertas com gelatina. Após incubação das células por 90 min a 37°C em 5% de  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante contendo cardiomiócitos que não aderiram foi removido e essas células foram plaqueadas a densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL. No dia seguinte, o meio foi substituído por DMEM-10% SFB, e as culturas foram mantidas até os cardiomiócitos formarem um sincício com contratilidade sincronizada.

Os macrófagos residentes foram obtidos após a lavagem do peritônio de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para TLR2 com PBS gelado. Após a centrifugação do lavado, as células foram plaqueadas a densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL em meio RPMI-10% SFB em placas de 24 poços contendo lamínulas. As culturas de macrófagos residentes foram utilizadas após 24h.

As células de músculo liso humano (estômago) obtidas no banco de células do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), foram mantidas em meio DMEM-10% SFB e plaqueadas em placas de 24 poços a densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço em meio DMEM-10% SFB. As culturas foram utilizadas após 24h. Antes do ensaio de invasão (descrito posteriormente), as culturas foram lavadas 3 vezes com



HBSS e suplementadas com DMEM contendo 1 mg/mL de albumina humana (Octapharma).

Células de ovário de Hamster (CHO) transfectadas com cDNA do receptor ETa (CHO-ETaR) ou ETb (CHO-ETbR) e sua célula controle (CHO-K1- controle transfectadas com o plasmídeo (pcDNA3) obtidas da ATCC e foram cultivadas em meio Ham's F12 (SIGMA) com 10% (vol/vol) de SFB a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> (gentilmente cedidas pelo Dr. Herbert Tanowitz).

#### **4.3 - Imunofluorescência / Confocal**

Células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs) foram plaqueadas em lamínulas de 13-mm a uma densidade de 10<sup>5</sup> células/poço em meio M199 suplementado com 10% de SFB e cultivadas em placas de 24 poços por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram estimuladas com tGPI-mucina (10nM) purificada da cepa Y de TCT (gentilmente cedida pelo Prof. Igor Almeida) ou com tripomastigotas de cultura de tecido (10:1– parasita:célula hospedeira) ou com o meio condicionado gerado por 3x10<sup>7</sup> tripomastigotas por 2h em meio M199-10% de SFB. Em seguida, a monocamada de células foi lavada 2 vezes em PBS e fixada em paraformaldeído 4% por 10 minutos. Depois, as monocamadas foram lavadas 3 vezes em PBS- BSA 3% (Sigma) e incubadas em 50mM de NH<sub>4</sub>Cl (Sigma). Após 30 minutos, as células foram lavadas em PBS-BSA 3% e incubadas por 16h com o anticorpo primário anti-B<sub>1</sub>R humano na diluição de 1:100 ou anti-B<sub>1</sub>R + peptídeo bloqueador (gentilmente cedidos pelo Dr. Jean Bascand, Universidade de Toulouse, França). O peptídeo bloqueador foi incubado por 1h com anti-B<sub>1</sub>R na concentração final de 10µg/mL a 4°C. Soro normal de coelho (1:100) foi utilizado como controle negativo. No dia seguinte, a monocamada de células foi lavada 2 vezes em PBS, 1 vez em PBS-

BSA 3% e foi incubada por 1h no anticorpo secundário anti-rabbit-FITC (1:100) (SIGMA) protegida da luz. Após esse período, as células foram lavadas 8 vezes em PBS. As lamínulas foram montadas em lâminas contendo n-propil galato, seladas com esmalte e armazenadas a -20°C até a análise. As imagens foram analisadas em Microscópio Fluorescência Axiovert.

#### **4.4 – PCR em tempo real: Indução de B<sub>1</sub>R**

HUVECs foram plaqueadas a densidade de  $10^6$  células/mL em meio M199 suplementado com 10% de SFB e cultivadas em placas de 6 poços por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram estimuladas com tGPI-mucina (10nM) ou TCT (10:1) ou meio condicionado por essas tripomastigotas ( $3 \times 10^7$ ) por 2h em meio M199-10% de FCS. Após esse período, a monocamada de células foi lavada 2 vezes em PBS, e depois tripsinizada com Tripsina-EDTA. As células foram lavadas em 25mL de PBS gelado estéril, centrifugadas a 100g por 10 minutos e adicionados 300 µL de solução desnaturante gelada (Kit RNAgents total RNA isolation system, Promega). A suspensão foi agitada vigorosamente em vortex e adicionados 30µL de acetato de sódio 2M pH 4.0 (Kit RNAgents total RNA isolation system, Promega). Posteriormente, 300µL de fenol:clorofórmio (Kit RNAgents total RNA isolation system, Promega) foram adicionados, agitando-se a solução vigorosamente por 10 segundos. A suspensão foi incubada por 15 minutos no gelo. Após o período de incubação, a suspensão foi centrifugada a 10000g por 20 minutos a 4°C, visualizando-se duas fases. A fase superior aquosa foi transferida para um tubo novo contendo um volume igual de isopropanol (Kit RNAgents total RNA isolation system, Promega). A suspensão foi, então, incubada por 30 minutos a -20°C e, posteriormente, centrifugada a 10000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao pellet 1mL de etanol 75% gelado. Após

centrifugação a 10000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspensionado em água livre de RNase (Kit RNeasy total RNA isolation system, Promega). A dosagem do RNA total foi realizada em espectrofotômetro (DGV – Programmable Reader) no comprimento de onda de 260nm. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1% (sigma).

Os sistemas TaqMan<sup>®</sup> e SYBR-Green<sup>®</sup> de RT-PCR em tempo real foram usados para quantificação da expressão gênica. As PCRs TaqMan<sup>®</sup> foram realizadas no volume final de 20 µL contendo 100 ng de cDNA, 10 µL do TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix 2x e 1 µL de uma mistura contendo oligonucleotídeos *sense* e *antisense* (18 µM cada) e uma sonda associada a um fluoróforo FAM<sup>®</sup> (5 µM) específicos para os cDNAs de interesse. As amostras foram submetidas a um protocolo padrão (50 °C-2 min, 95 °C-10 min, e 50 ciclos de 95 °C-15s e 60 °C-1 min) em que a fluorescência era detectada ao final de cada ciclo pelo aparelho ABI 7000 (Applied Biosystems). Com este método nós analisamos a expressão do mRNA do receptor B<sub>1</sub> (sonda: 5'-CACAGGAACCCAGACAG-3'; óligos: 5'-CCATACAAAACCCCAGCTGAA-3' e 5'-CTTTGGTTAGAAGGCTGTAGCTTCA-3') e da β-actina (sonda: 5'-CTGATCCACATCTGCT-3'; óligos: 5'-CTGGCCTCACTGTCCACCTT-3' e 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCTT-3').

#### 4.5 - Ensaio de Invasão

Culturas celulares de HUVECs, cardiomiócitos murinos, HSMCs, macrófagos peritoneais isolados de C57BL/6 selvagens (TLR2<sup>+/+</sup>) e nocautes para TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) foram plaqueadas em lamínulas de 13-mm com densidade de 10<sup>5</sup> células/poço em meio de cultura apropriado suplementado com 10% SFB. As células foram cultivadas em placas de 24 poços por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Antes da

adição dos TCT, as lamínulas foram lavadas por 3 vezes em HBSS e adicionado meio de cultura livre de soro contendo 1 mg/mL de albumina humana. Os TCT foram adicionados na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) e incubados por 3h a 37°C ou conforme especificado. Quando indicado, as culturas foram suplementadas com lisinopril (25  $\mu$ M, Sigma), antagonista de B<sub>2</sub>R - HOE 140 (0,1 $\mu$ M, Sigma) (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000) ou antagonista de B<sub>1</sub>R [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (1  $\mu$ M, SIGMA). Os anticorpos anti-TLR2 e anti-TLR4 (Santa Cruz) e seu isotipo controle IgG2a (gentilmente cedido pelo Dr. Herbert Tanowitz) foram testados na concentração final de 1 $\mu$ g/mL. O anticorpo monoclonal anti-TLR2 foi gentilmente cedido pelo Dr. Carsten Kirschning (MENG *et al.*, 2004)

Para caracterizar as vias de sinalização envolvidas na internalização dos TCT acrescentamos ao meio: (1) 10 nM de wortmanina (inibidor da via PI3K) por 1h, (2) 100  $\mu$ M de MDL-12 (inibidor da enzima adenilato ciclase) por 30 minutos, (3) 0,5  $\mu$ M de taspigargina (depleta estoques intracelulares de Ca<sup>+2</sup>) por 30 minutos ou 0,4  $\mu$ g/mL de Toxina Pertussis (inativador da proteína G<sub>i</sub>) por 4 horas. Após o período de incubação, conforme indicado, as células foram lavadas 3 vezes com HBSS e foi adicionado meio fresco contendo 1mg/mL de albumina humana. Os TCT foram adicionados na proporção de 10:1 (parasita:célula hospedeira). Após 1h de interação, os parasitas extracelulares foram removidos, e as monocamadas foram fixadas em Bouin (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000) e coradas com Giemsa (Sigma).

Para avaliar a participação do B<sub>1</sub>R no mecanismo de invasão celular, HUVECs foram lavadas 3 vezes com HBSS e em seguida (i) estimuladas com 5 ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma) ou (ii) 10 nM de tGPI-mucina ou sobrenadante da secreção de 3 x 10<sup>7</sup> tripomastigotas em M199-10% de SFB (meio condicionado). Nos experimentos com músculo liso humano utilizou-se 25 nM

de tGPI-mucina. Após 2h de ativação a 37°C as células tratadas com LPS, tGPI-mucina, meio condicionado ou apenas em meio com soro, foram lavadas com 3 vezes com HBSS, os TCT foram adicionados na proporção de 5:1 ou conforme indicado (parasita:célula hospedeira). Após 3h de interação, os sobrenadantes das culturas celulares contendo parasitas que não invadiram células foram removidos. A monocamada celular infectada foi lavada 3 vezes em HBSS e 1 vez em PBS, seguida da fixação com a solução de Bouin e coloração com Giemsa. O índice de infecção foi determinado através da quantificação do número de parasitas intracelulares em 100 células por lamínula.

#### **4.6 - Entrada x Retenção na célula hospedeira**

Para avaliar os níveis de entrada/retenção dos TCT em células de músculo liso humano, os ensaios de entrada/retenção foram realizados, conforme descrito por SANTOS (tese de doutorado de Camila Chaves Santos). Esse protocolo envolve a adição dos TCT (100µl) diretamente sobre a monocamada de células, na proporção de 20:1 (parasita: célula hospedeira). Para avaliar a eficiência da entrada, os parasitas extracelulares foram removidos após 10 minutos e incubadas por mais 10 minutos, em meio DMEM contendo 1mg/mL de albumina humana a 37°C, e em seguida fixadas. Para avaliar os níveis de retenção, as células foram incubadas por mais 40 minutos a 37°C, e então foram fixadas. As lamínulas fixadas em solução Bouin foram coradas com Giemsa e o número de parasitas internalizados foi avaliado em microscópio ótico.

Quando indicado, as células foram tratadas com o antagonista do receptor ETa (1µM) (BQ-123-American Peptide) ou ETb (10µM) (BQ-788-Calbiochem), anticorpos monoclonais neutralizantes anti-TLR2 (1µg/ml) (gentilmente cedido pelo Dr. Carsten Kirschning) e anti-TLR4 (1µg/ml) (Santa Cruz) ou seu isotipo controle - IgG2a (1µg/ml

– gentilmente cedido pelo Dr. Herbert Tanowitz) para discriminar a participação dos receptores envolvidos na entrada e retenção dos parasitas na célula hospedeira.

#### **4.7 - Determinação da produção da citocina IL-6 e da quimiocina IL-8 *in vitro***

HUVECs foram plaqueadas a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células em meio M199 suplementado com 10% SFB e foram cultivados em placas de 24 poços por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As HUVECs foram estimuladas ou não com 10nM de tGPI-mucina ou tripomastigotas Dm28c na proporção 5:1 (parasita:célula) por 3h na presença de meio suplementado com 10% SFB. Após esse tempo, as células foram lavadas 3x em HBSS e foi adicionado meio contendo 10% SFB. Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos após 18h, centrifugados (850 x g por 5 min a 4°C) para remoção dos parasitas e congelados para posterior análise da quimiocina.

Para determinação de IL-8 e IL-6 foi realizado um ELISA de captura (R&D Systems). A concentração da quimiocina foi avaliada através de curva-padrão preparada com a quimiocina recombinante. Os valores de concentração representam a média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas. As análises estatísticas entre os valores de média foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA) com  $p < 0,05$  ao nível de significância.

#### **4.8 - Determinação da molécula de adesão E-selectina *in vitro***

HUVECs foram plaqueadas a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células em meio M199 suplementado com 10% SFB e foram cultivados em placas de 96 poços por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>. As HUVECs foram estimuladas ou não com 10nM de tGPI-mucina ou TCT Dm28c na proporção especificada de parasita:célula por 6h na presença de meio suplementado com 10% SFB. Após esse tempo, as células

foram fixadas em 1% de paraformaldeído por 10 minutos, e bloqueada com 5% de leite molico, após 1 hora as células foram lavadas 3x em PBS Tween 0,05% e incubadas no anticorpo anti- E-selectina (1:100). Após 2 horas as células foram lavadas 3x em PBST e incubadas no anticorpo secundário anti-mouse conjugado a peroxidase (1:5000) por 1h. Após lavagem, o substrato BD Opteia (substrato A + substrato B; vol/vol) foi adicionado por 30 minutos e a reação foi paralisada em 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O ELISA foi lido na absorvância de 450nm.

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas As análises estatísticas entre os valores de média foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA) com  $p < 0,05$  ao nível de significância.

#### **4.9 - Análise Histopatológica**

Os experimentos foram realizados com camundongos das linhagens C57BL/6 (WT) ou C57BL/6 B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, fêmeas, 35-50 g, mantidos a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  em um ciclo claro-escuro de 12h. Quando indicado, os animais foram previamente tratados intraperitonealmente (i.p.) com o inibidor da ECA, captopril (4mg/kg) (Sigma), 1 hora antes da injeção dos parasitas. Os animais foram inoculados na pata com  $10^6$  TCT em PBS. Após 4 meses de infecção, os camundongos (4 animais por grupo) foram sacrificados e os corações coletados em OCT (Tissue Tek) para análise histopatológica. Os corações, embebidos em OCT, foram cortados em secções de  $7\mu\text{m}$  e corados com hematoxilina–eosina (H&E) (Sigma) ou Picrosirius (Sigma) para detecção da fibrose. As amostras foram analisadas no microscópio Zeiss Axiovert 135 acoplado a AxioCam HR CCD de alta resolução com câmera de vídeo (Zeiss, Germany). A fibrose foi analisada em pelo menos 30 campos da secção do coração. A quantificação da fibrose foi feita por determinação digital da área de fibrose corada em vermelho (Image Pro

Plus 5.01, Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA) a partir de 30 campos da mesma secção. Os resultados foram expressos como área relativa de fibrose nos campos analisados.

#### **4.10 - PCR em tempo real: B<sub>1</sub>R<sup>+/+</sup> x B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>**

Para analisar a resposta inflamatória em camundongos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, analisamos o perfil de quimiocinas presentes no coração por PCR em tempo real.

Para isolar o RNA total dos corações, o tecido foi embebido em TRIZOL<sup>®</sup> (Gibco) (10<sup>6</sup> células/1mL de TRIZOL<sup>®</sup>) e homogeneizado em Tissuemizer. O material foi deixado a temperatura ambiente por 5 minutos permitindo a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Em seguida, adicionou-se 200µl de clorofórmio (Merck) (agitados por 15 segundos) e a suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 3 minutos. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 9000g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um tubo novo. O RNA foi precipitado da fase aquosa, adicionando-se 500µl de isopropanol (Merck) por 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 4500g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado com 1 ml de etanol 75% a 4500g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi, então, ressuspensionado em 20µl de H<sub>2</sub>O DEPC (dietil pirocarbonato – 0,1% final) (Sigma). A dosagem do RNA foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm e a integridade avaliada em gel de agarose 1%.

O cDNA foi sintetizado utilizando o Superscript II reverse transcriptase (Gibco). Uma curva padrão de 3.05 pg a 30.5ng para a quantificação por Real time PCR foi feita utilizando os primers específicos para CCL5/RANTES F(5'TGG AGA TGA GCT AGG ATA GAG G 3') R(5' AGT AGG GGA TTA CTG GAG TGG 3') e CCL3/MIP-1α F(5' TCT CTG TAC CAT GAC ACT CTG C 3'); R(5' GTA TTC TTG GAC CCA



GGT CTC T 3'). O PCR quantitativo foi realizado utilizando 400 ng de cDNA, 1ng do primer RANTES-F/ RANTES-R e MIP-1 $\alpha$ -F / MIP-1 $\alpha$ -R que amplifica um produto de 113pb e 123pb respectivamente, 25mM de MgCL<sub>2</sub>, LigftCycler FastStart Master SYBER Green I (Roche Applied Science), e água para PCR (Roche Applied Science) a um volume total de 20 $\mu$ L. Uma reação em pararela foi feita para cada amostra, utilizando 10 ng do DNA genômico e 1ng do primer GAPDH F (5'TAG AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC 3'); R (5' CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC 3'), que amplifica um produto de 983 pb. Essas reações foram misturadas e adicionadas em capilares, tampados e centrifugados a 300 x g por 10 segundos, e colocados no LightCycler. Na fase de desnaturação, os capilares são aquecidos até 95°C a 20°C / segundo e se mantém por 10 minutos. Durante 45 ciclos da fase de amplificação, são três etapas: 95°C por 5 segundos, 55°C por 5 segundos, e 72°C por 10 segundos, todos a 20°C / segundo. Durante a fase de extensão, a intensidade de fluorescência é adquirida como um simples detector de cor (SYBER Green I). A terceira fase foi mantida a 95°C a 20°C / segundo por 0 s, 65°C a 20°C /s por 15s, e finalmente 95°C a 0.1°C /s por 0s. Durante a fase de anelamento, o setting de aquisição é "contínuo". A fase final é a fase de esfriamento, que nos últimos 30 s a 40°C a 20°C / s. A aquisição e análise dos dados foi feita com LightCycler software versão 3.0.

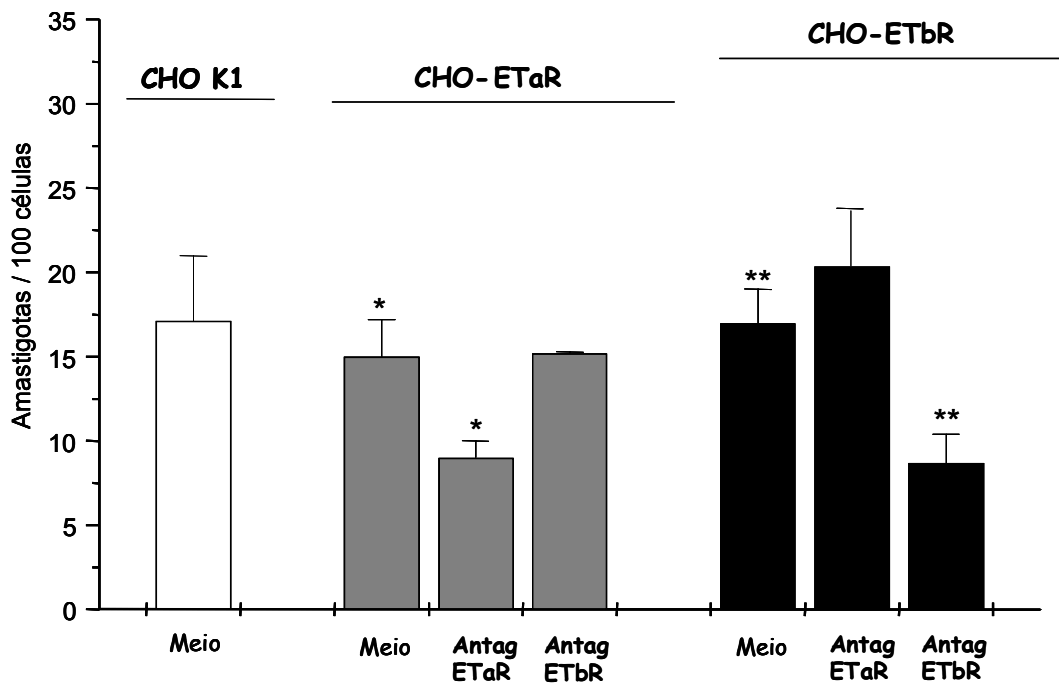
#### **4.11 - Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism. Comparações entre médias de mais de dois grupos foram feitas utilizando análise de variância (ANOVA). Quando os valores de média dos grupos apresentam diferenças significativas, realizamos a comparação entre os pares das médias usando o teste de Tukey (ANOVA).  $p < 0,05$  foi considerado.

## 5 - Resultados

### 5.1 – Envolvimento de receptores de endotelina na invasão celular

SANTOS (tese de doutorado de Camila Chaves Santos, 2006), verificaram que HSMCs em estado de repouso (isto é, não ativadas por estímulos pró-inflamatórios) são um modelo adequado para investigar as vias de sinalização envolvidas nas etapas de entrada e retenção do *T. cruzi*. Enquanto a participação do cálcio intracelular é importante na etapa de entrada do parasita na célula hospedeira, o pré-tratamento das células com inibidores de PI3K promoveram aumento significativo da taxa de retenção dos TCT Dm28c em comparação com o controle não tratado, sugerindo uma modulação negativa da PI3K na retenção do parasita na célula hospedeira. Segundo os autores, a invasão de HSMCs (repouso) não envolve a participação de B<sub>2</sub>R (CHAVES *et al.*, em preparação). Tendo em vista as evidências apontando o envolvimento da via de endotelina na ativação de células endoteliais e músculo liso (revisado por KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001), achamos que seria pertinente examinar o efeito dos antagonistas de ETaR e ETbR nos mecanismos de entrada e retenção do parasita na célula hospedeira. Em busca de uma prova de princípio, primeiramente utilizamos monocamadas sub-confluentes de células CHO que super expressam os receptores ETa (CHO-ETaR) ou ETb (CHO ETbR), ou CHO controle (CHO-K1) na presença ou ausência dos antagonistas específicos para esses receptores. Após 3h de interação (parasita:célula hospedeira - 5:1) em meio HAM's F12-albumina humana, verificamos que a adição dos antagonistas específicos para ETaR ou ETbR em células CHO-ETaR ou CHO-ETbR foram parcialmente capazes de inibir a invasão dos TCT respectivamente em torno de 40% e 55%. Esses resultados indicam que os tripomastigotas são capazes de infectar células CHO através da ativação dos dois subtipos de receptores de endotelina: ETaR ou ETbR. (figura 1).

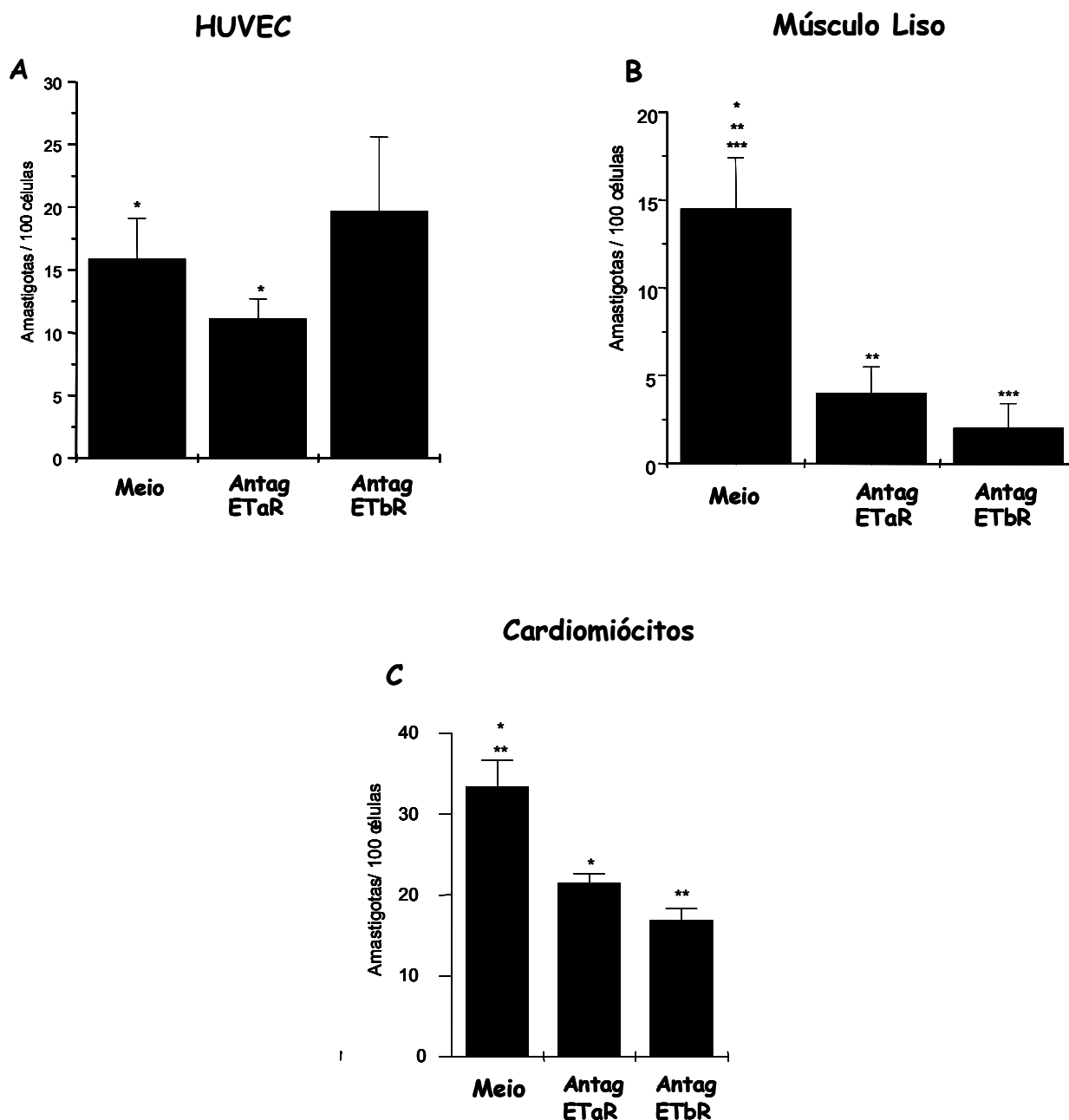


**Figura 1- TCT Dm28c invadem células CHO através da ativação de receptores de endotelina**

TCT Dm28c foram incubados com células CHO transfectadas com (i) receptores de endotelina CHO-ETaR, (ii) CHO-ETbR na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) por 3h a 37°C, em meio Ham's F-12-albumina humana. Onde indicado, foi adicionado 10  $\mu$ M de BQ-788 (antagonista ETbR) ou 1 $\mu$ M BQ-123 (antagonista ETaR). Após esse período as células foram lavadas e fixadas em Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias  $\pm$  SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=2)

Para verificar se os TCT são capazes de utilizar os receptores de endotelina durante a invasão de células que expressam naturalmente esses receptores, realizamos ensaios de invasão com três tipos celulares: HMSCs, HUVECs e cardiomiócitos de camundongos. Cabe ressaltar que as HMSCs e os cardiomiócitos expressam os dois subtipos de receptores de endotelina, ETaR e ETbR, enquanto que as células endoteliais expressam apenas o subtipo ETbR (revisado por KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001).

Conforme demonstrado na figura 2, a infecção de HSMCs foi parcialmente inibida tanto por antagonista de ETaR (75%) quanto por antagonista de ETbR (85%). Em cardiomiócitos murinos, a adição dos antagonistas de ETaR ou ETbR no momento da infecção reduziu a invasão em torno de 30% e 35% respectivamente. Consistente com a expressão seletiva de ETbR em HUVECs, a adição do antagonista de ETbR reduziu a invasão em torno de 40%, enquanto o antagonista de ETaR não teve efeito. Esses resultados indicam que os parasitas invadem esses diferentes tipos de células mediante ativação de receptores de endotelina (Figura 2A, 2B, 2C).



**Figura 2- Tripomastigotas de *T. cruzi* invadem células endoteliais, musculares e cardiomiócitos através da ativação de receptores de endotelina**

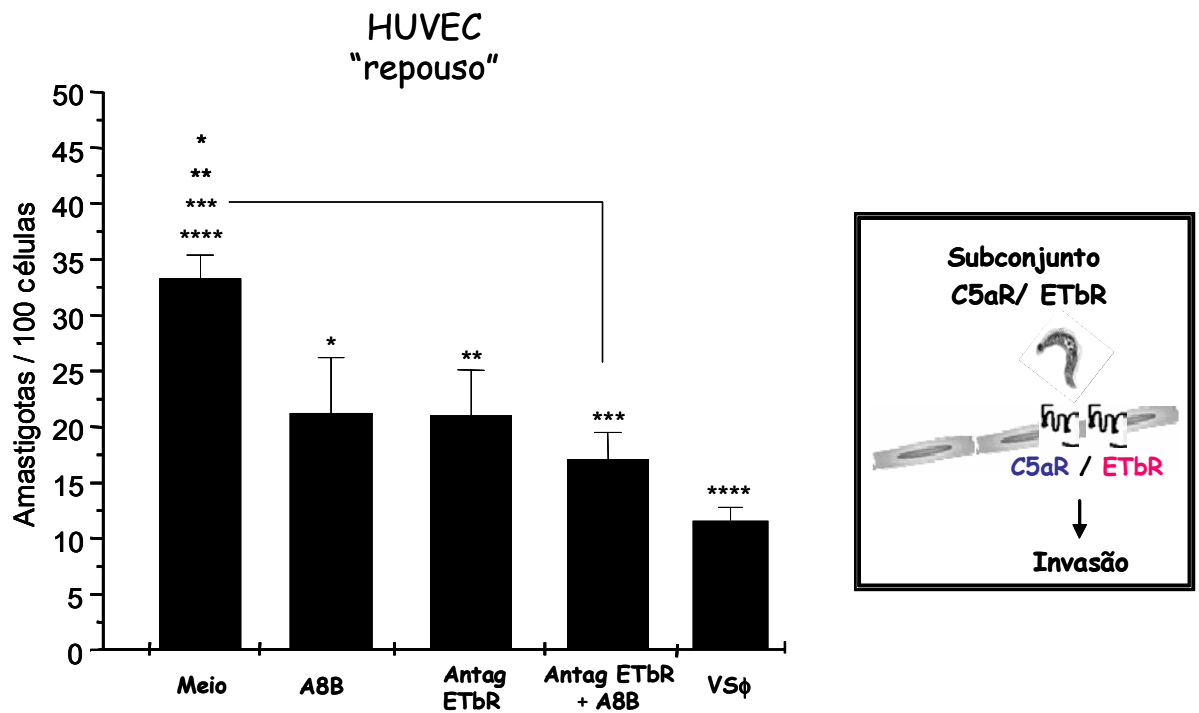
(A) HUVECs (B) células de músculo liso humano e (C) Culturas primárias de cardiomiócitos de camundongos foram incubadas com TCT Dm28c na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) por 3h em meio DMEM suplementadas com albumina humana. Onde indicado, foi adicionado 10  $\mu$ M de BQ-788 (antagonista ETbR) ou 1 $\mu$ M BQ-123 (antagonista ETaR) momentos antes da interação. Após esse período, as células foram lavadas, fixadas em Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias  $\pm$  SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=3).

## 5.2 – Cooperação entre GPCRs: ETbR/C5aR

A existência de interações diretas entre vários receptores acoplados a proteína G (GPCRs) tem sido demonstrada por uma variedade de técnicas bioquímicas, fisiológicas e farmacológicas (BOUVIER, 2001; DEVI, 2001), por exemplo, a heterodimerização do receptor B<sub>2</sub> com receptores de angiotensina II do tipo I (AT<sub>1</sub>R) em células HEK 293 (ABDALLA *et al.*, 2000). Acredita-se que a formação desses complexos possa modular a transdução de sinal em vários níveis, incluindo a ligação com o próprio ligante (JORDAN *et al.*, 2001; ROCHEVILLE *et al.*, 2000), influenciando por conseguinte na eficiência e potência da sinalização (ABDALLA *et al.*, 2000).

Motivados por esses estudos, resolvemos investigar a relação funcional entre os receptores ETbR e C5aR no mecanismo de invasão de células endoteliais.

Os resultados mostram que HUVECs tratadas com o antagonista de ETbR ou A8B apresentam taxas semelhantes de inibição da invasão (38%), demonstrando a participação dos receptores C5a na invasão de células endoteliais *in vitro*. Com efeito, a adição conjunta do A8B com antagonista de ETbR não apresentam efeitos inibitórios aditivos, sugerindo a existência de cooperação entre esses dois receptores (C5aR/ETbR).



### Figura 3 – Mecanismos de invasão interdependentes: C5aR/ETbRs

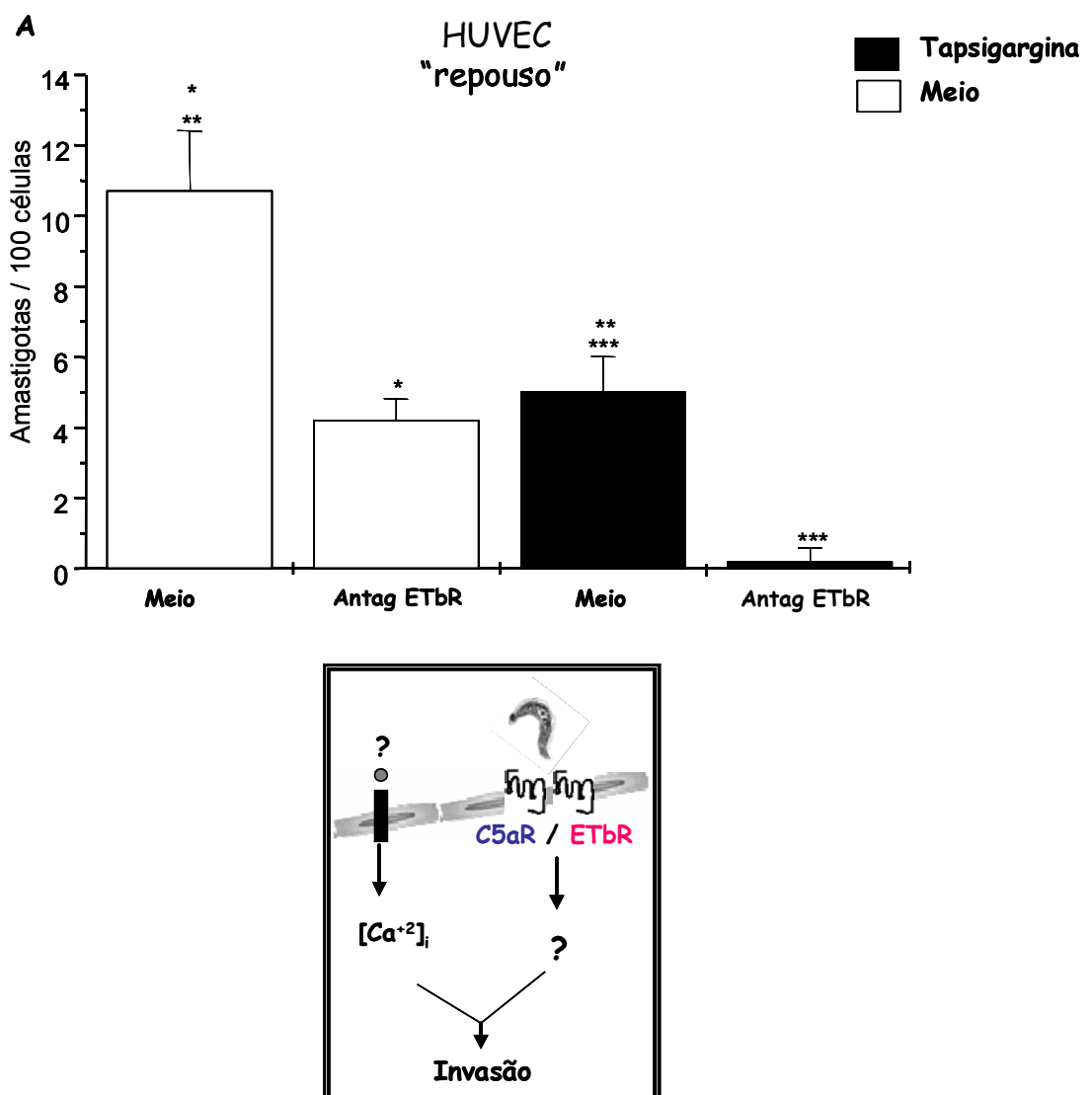
HUVECs foram incubadas por 3h com TCT Dm28c na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) em meio M199 suplementado com albumina humana. Onde indicado, foi adicionado 10 $\mu$ M de BQ-788 (antagonista de ETbR) ou 100nM de A8B (antagonista de C5aR) ou 10 $\mu$ M de VS $\phi$  (inibidor de cruzipaina). A interação celular procedeu por 3h a 37°C. O número de parasitas intracelulares foi determinado or contagem em microscópio óptico. Os valores são reportados como média  $\pm$  SD do número de parasitas intracelulares por 100 células (triplicata). As diferenças estatísticas ( $P < 0.05$ ) entre as barras são marcados com letras iguais. (n=3)

### 5.3- Análise das vias de sinalização ativadas pelos tripomastigotas Dm28c

Diversos estudos têm relatado a mobilização de cálcio da célula hospedeira como um requisito fundamental para o processo de invasão pelo *T. cruzi* (TARDIEUX *et al.*, 1994; RODRIGUEZ *et al.*, 1995; BURLEIGH *et al.*, 1997; CALER *et al.*, 1998; SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Sabe-se que a ativação de ETaR em células de músculo liso elicitam uma contração duradoura através do aumento nas concentrações de cálcio citosólico e ativação de Rho cinases (SEO *et al.*, 1994; SEKO *et al.*, 2003). Por outro lado, a ativação de ETbR em células endoteliais estimula a liberação de NO e de prostaciclina promovendo o relaxamento da musculatura vascular lisa indiretamente (de NUCCI *et al.*, 1988).

Para analisar se a depleção de cálcio interfere na invasão celular, as HUVECs foram incubadas com taspargina, droga que depleta estoques de  $Ca^{+2}$  de retículo endoplasmático (THASTRUP *et al.*, 1990) por 30 minutos antes da interação com os TCT. A adição da taspargina reduziu a invasão em 50%, o que indica que os parasitas dependem da mobilização de estoques intracelulares de  $Ca^{+2}$  para invadir HUVECs. É interessante notar que a administração conjunta de taspargina e do antagonista de ETbR abole a invasão das células endoteliais. Esses dados indicam que a via de entrada dependente de endotelina, ETbR, nas HUVECs provavelmente não depende da mobilização de  $Ca^{+2}$  intracelular. Entretanto, nossas experiências não excluem a participação de estoques de cálcio provenientes da abertura de canais (SOCCs ou NSCCs) via ETbR (revisado por KAWANABE e NAULI, 2005; IWAMURO *et al.*, 1998; GOTO *et al.*, 1989). Dessa forma, podemos sugerir que as vias de entrada mediada por mobilização de  $[Ca^{+2}]_i$  e pela via ETbR tem efeitos independentes e complementares no mecanismo de invasão de HUVECs.



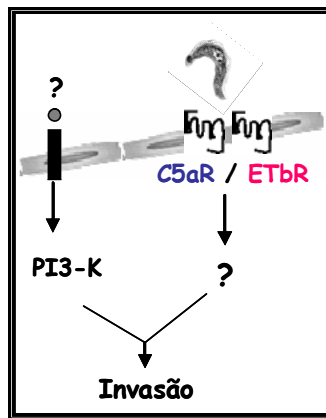
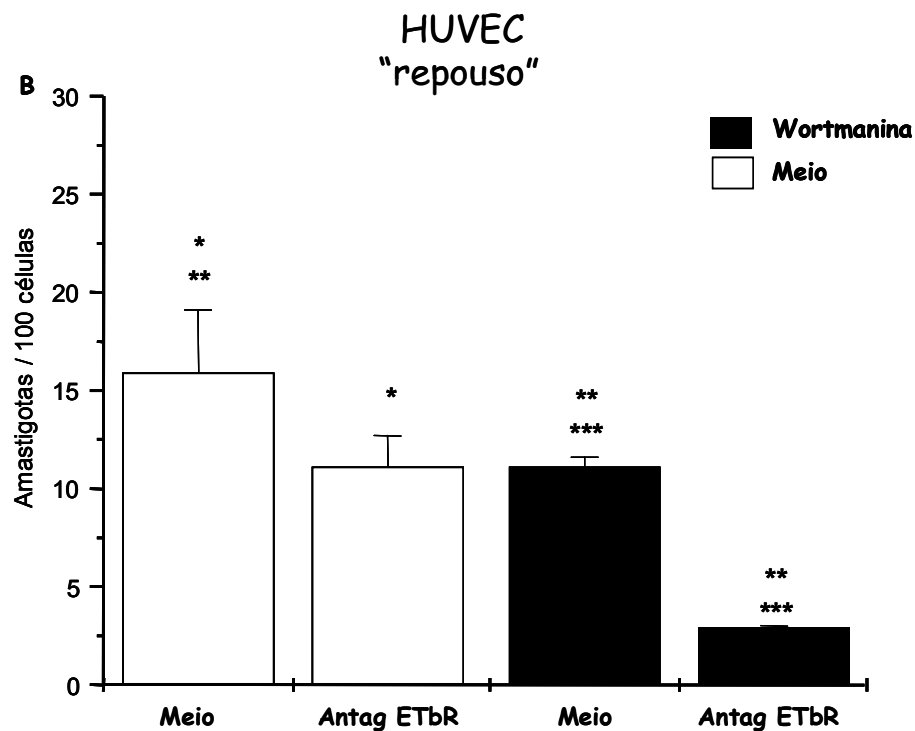


**Figura 4 – Complementariedade entre as vias de invasão  $[Ca^{+2}]_i$  e ETbR**

HUVECs foram previamente incubadas (barras pretas) ou não (barras brancas) com 0,5  $\mu$ M de tapsigargina por 30 minutos à 37°C em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as células foram lavadas, submetidas à interação com TCT Dm28c na proporção de 10:1 (parasita:célula hospedeira) por 1h a 37°C, em meio DMEM suplementado com albumina humana, na presença ou ausência de 10 $\mu$ M de BQ-788 (antagonista de ETbR). Após esse período as células foram lavadas, fixadas em Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias  $\pm$  SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=3)

Recentemente SANTOS e cols. demonstraram que o pré-tratamento de HSMCs com o inibidor da PI3K resultou em aumento significativo da invasão pelos TCT Dm28c, indicando que a PI3K atua como um modulador negativo da invasão mediada pela cruzipáina. Vale ressaltar que essa modulação negativa ocorre de maneira cepa específica, uma vez que a invasão da cepa Y em HSMCs pré-tratadas com wortmanina foi inibida significativamente, corroborando os dados descritos na literatura para a invasão de outros tipos celulares por essa cepa (WOOLSEY *et al.*, 2003; ANDRADE e ANDREWS, 2004).

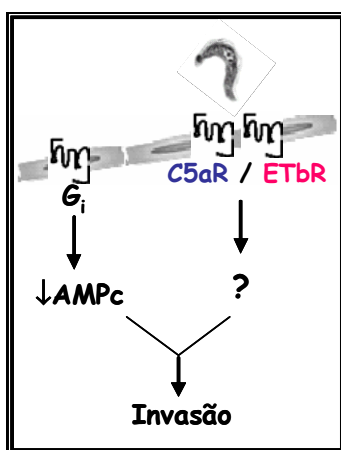
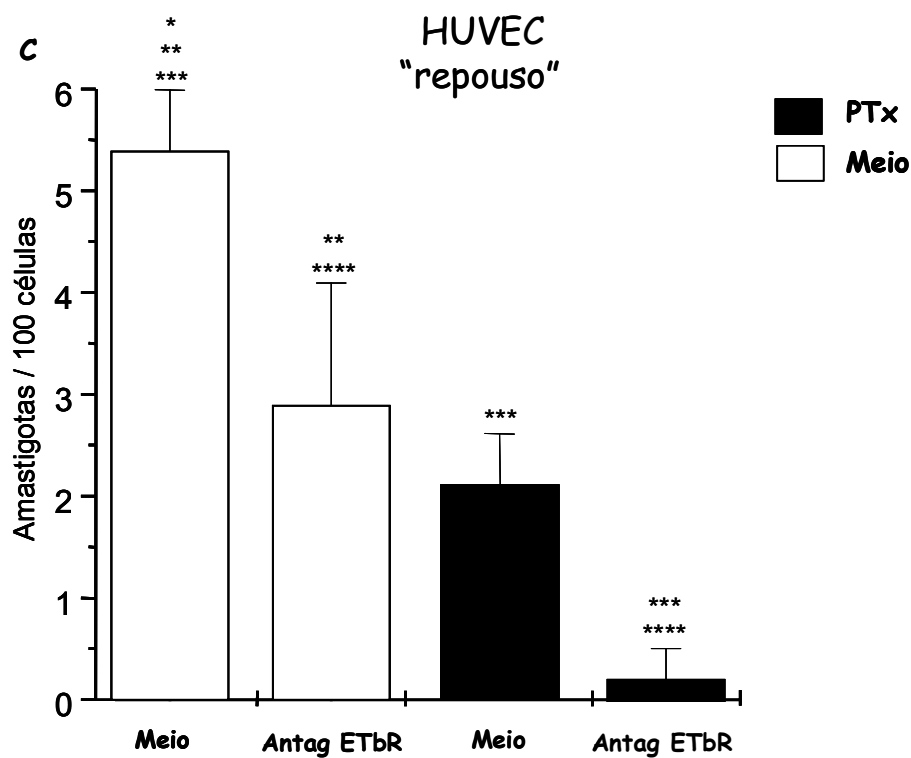
Nessa mesma linha, avaliamos a participação da PI3K na invasão de HUVECs por tripomastigotas da cepa Dm28c. O tratamento prévio das células endoteliais com wortmanina, inibidor irreversível da PI3K, na ausência de soro por 1h antes da adição dos TCT, resultou em uma diminuição de 30% na taxa de invasão dos TCT Dm28c quando comparados com as células controles, sugerindo que a ativação da PI3K contribui para o processo de invasão de células endoteliais. Para verificar se a ativação de PI3K é controlada por ETbR, repetimos a experiência anterior com wortmanina, dessa vez adicionando o antagonista de ETbR momentos antes da invasão. Nessas condições, observamos que a adição conjunta dessas drogas foi capaz de reduzir a taxa de invasão em 75% em relação aos controles tratados apenas com wortmanina (25%) ou antagonista de ETbR (25%), sugerindo que as vias ETbR e PI3K-dependentes exercem funções complementares, no mecanismo de invasão de HUVECs (Figura 5).



**Figura 5- Vias de sinalização independentes: PI3K x ETbR**

HUVECs foram previamente incubadas (barras pretas) ou não (barras brancas) com 10 nM de wortmanina por 1 hora a 37°C em meio DMEM suplementado com albumina humana. Em seguida, as células foram lavadas, submetidas à interação com TCT Dm28c na proporção de 5:1 (parasita: célula hospedeira) por 3h a 37°C, em meio DMEM suplementado com albumina humana, na presença ou ausência de 10µM de BQ-788 (antagonista de ETbR). Após esse período, as células foram lavadas, fixadas em Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=2)

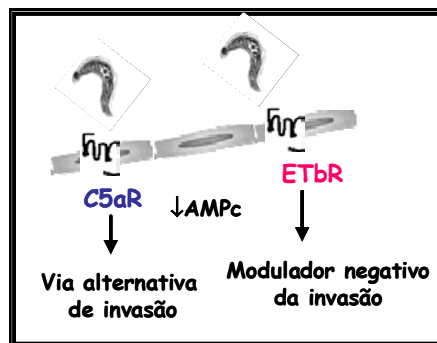
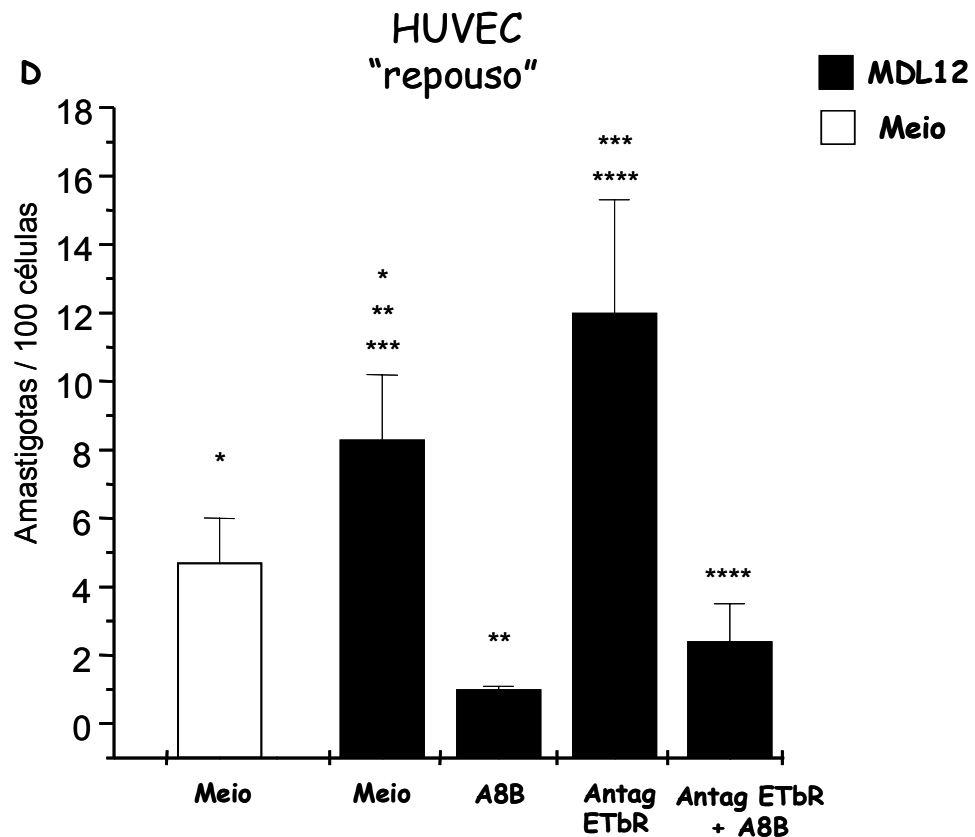
Considerando que receptores ETbR ativam principalmente proteínas G da família  $G_i$  e  $G_{q/11}$  (EGUCHI *et al.*, 1993; CRAMER *et al.*, 2001), resolvemos verificar se a adição da toxina PTx interfere sobre o mecanismo de invasão de HUVECs. Nossos resultados indicam que a PTx reduziu em 60% a invasão celular, indicando que a  $G_i$  está envolvida nesse processo. Entretanto a adição conjunta da PTx com o antagonista de ETbR reduziu ainda mais a invasão de HUVECs (75% em relação a taxa de invasão com PTx somente), indicando que a ativação de ETbR e a via de sinalização mediada por  $G_i$  são independentes, justificando assim os efeitos aditivos aqui demonstrados (Figura 6).



**Figura 6 –  $G_i$  é ativada por vias independentes de ETbR em HUVECs**

HUVECs foram previamente incubadas (barras pretas) ou não (barras brancas) com 0,4 $\mu$ g/mL toxina pertussis (PTx) por 4h a 37°C em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as células foram lavadas, submetidas à interação com TCT Dm28c na proporção de 10:1 (parasita:célula hospedeira) por 1h a 37°C, em meio DMEM suplementado com albumina humana, na presença ou ausência de 10 $\mu$ M do BQ-788 (antagonista de ETbR). Após esse período as células foram lavadas e fixadas em Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias  $\pm$  SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=2)

Complementando os estudos acima descritos, resolvemos avaliar se a invasão de HUVECs era dependente da geração de AMPc. Para isso, a monocamada de HUVEC foi incubada com o inibidor irreversível da enzima adenilato ciclase (MDL12) 30 minutos antes de acrescentar os TCT (1h de interação). Foi possível observar que a inibição da adenilato ciclase promoveu um aumento da taxa de invasão em 50%, indicando que a geração de AMPc regula negativamente a invasão de células endoteliais pelo *T. cruzi*. Surpreendentemente, a adição conjunta do MDL12 com o antagonista de ETbR promoveu um vigoroso aumento (3x) na infecção celular quando comparado às células tratadas apenas com MDL12, sugerindo que baixos níveis de AMPc revertem o efeito da sinalização dependente de ETbR, passando a modulador negativo da invasão. Quando ETbR é bloqueado há um aumento de invasão possivelmente às custas da ativação de C5aR, já que a adição do A8B nas células pré-tratadas com MDL12 e antagonista de ETbR apresentam inibição da invasão em torno de 90%. Os dados sugerem que os níveis de AMPc controlam o grau de inter-relação funcional do subconjunto ETbR/C5aR (Figura 7).



**Figura 7- Os níveis de AMPc controlam o grau de inter-relação funcional do subconjunto ETbR/C5aR**

HUVECs foram previamente incubadas (barras pretas) ou não (barras brancas) com 100 $\mu$ M de MDL12 (inibidor da adenilato ciclase) por 30 minutos a 37°C em meio DMEM suplementado com albumina humana. Em seguida, as células foram lavadas, submetidas à interação com TCT Dm28c na proporção de 10:1 (parasita:célula hospedeira) por 1h a 37°C, em meio DMEM-albumina humana, na presença ou ausência de 10 $\mu$ M de BQ-788 (antagonista de ETbR). Após esse período as células foram lavadas, fixadas em Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias  $\pm$  SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=2)

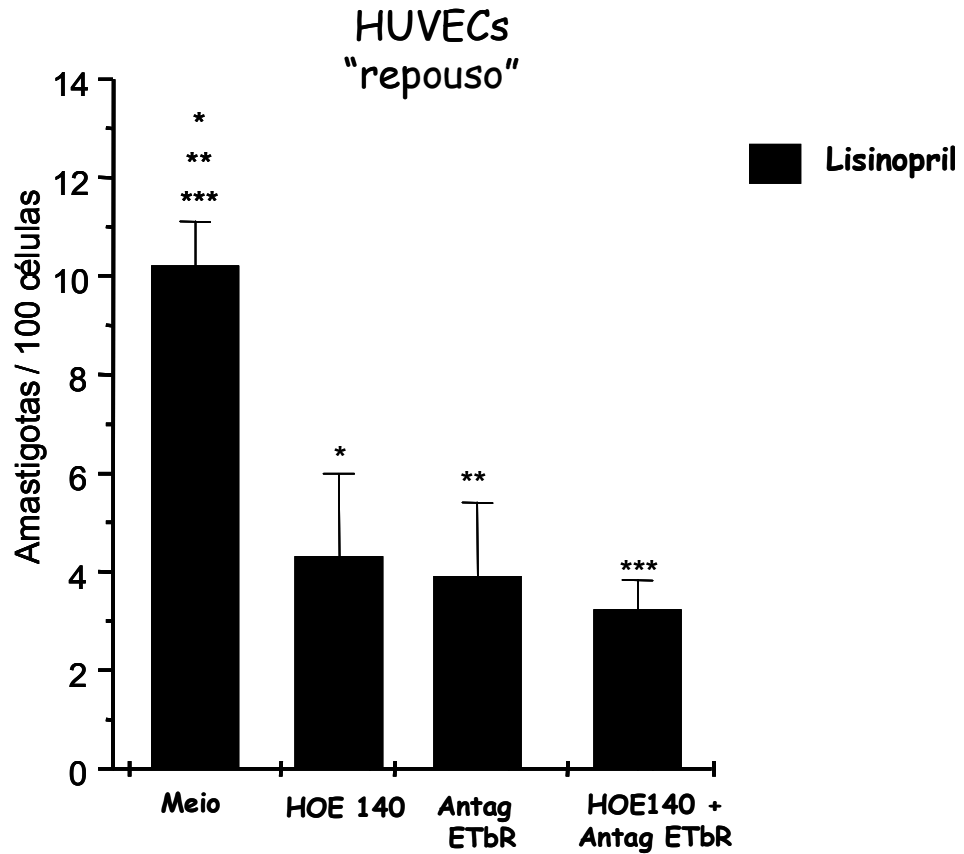
#### **5.4 – iECA influenciam a formação de subconjuntos de GPCRs responsáveis pela invasão de HUVECs (repouso)**

Conforme discutido na introdução, os TCT liberam cininas ao interagir com HUVECs, mas esses peptídeos são rapidamente degradados pela ECA, impedindo assim que o B<sub>2</sub>R seja ativado e, por conseguinte, contribuindo no mecanismo de invasão. Em trabalhos anteriores essa limitação pode ser experimentalmente contornada mediante a adição de inibidores da ECA nas culturas, por exemplo, lisinopril. Trabalhos recentes do nosso grupo indicam que a resposta edematogênica do *T. cruzi* depende de efeitos cooperativos entre TLR2, B<sub>2</sub>R (MONTEIRO *et al.*, 2006).

Tendo em vista esses dados, resolvemos investigar a relação funcional entre os receptores no mecanismo de invasão (B<sub>2</sub>R, ETbR e TLR2). Com essa finalidade, adicionamos lisinopril às culturas de HUVECs, conforme descrito em trabalhos anteriores (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; TODOROV *et al.*, 2003)

Os resultados mostram que, na presença do lisinopril, observa-se uma redução significativa da invasão em HUVECs tratadas com HOE-140 e antagonista de ETbR apresentando as mesmas taxas de inibição da invasão (55%) observados com os antagonistas acrescentados individualmente. Com efeito, a adição conjunta do HOE 140 com antagonista de ETbR não apresentam efeitos inibitórios aditivos. Isso sugere a existência de cooperação entre os receptores ETbR/B<sub>2</sub>R (Figura 8).





**Figura 8 - Lisinopril permite a ativação de B<sub>2</sub>R, tornando a invasão celular dependente de um subconjunto funcional formado por B<sub>2</sub>R/ETbR**

HUVECs foram incubadas por 3h com TCT Dm28c proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) em meio M199 suplementado com albumina humana na presença de lisinopril (25µM). Onde indicado, foi adicionado 10µM do antagonista de ETbR ou 0,1µM do Hoe140 (antagonista de B<sub>2</sub>R). A interação celular procedeu por 3h a 37°C. O número de parasitas intracelulares foi determinado or contagem em microscópio óptico. Os valores são reportados como média ± SD do número de parasitas intracelulares por 100 células (triplicata). As diferenças estatísticas (P<0.05) entre as barras são marcados com letras iguais. (n=3)

### **5.5 - iECA é um pré-requisito para recrutamento de TLR2/4 nos subconjuntos funcionais formados por B<sub>2</sub>R/ETbR**

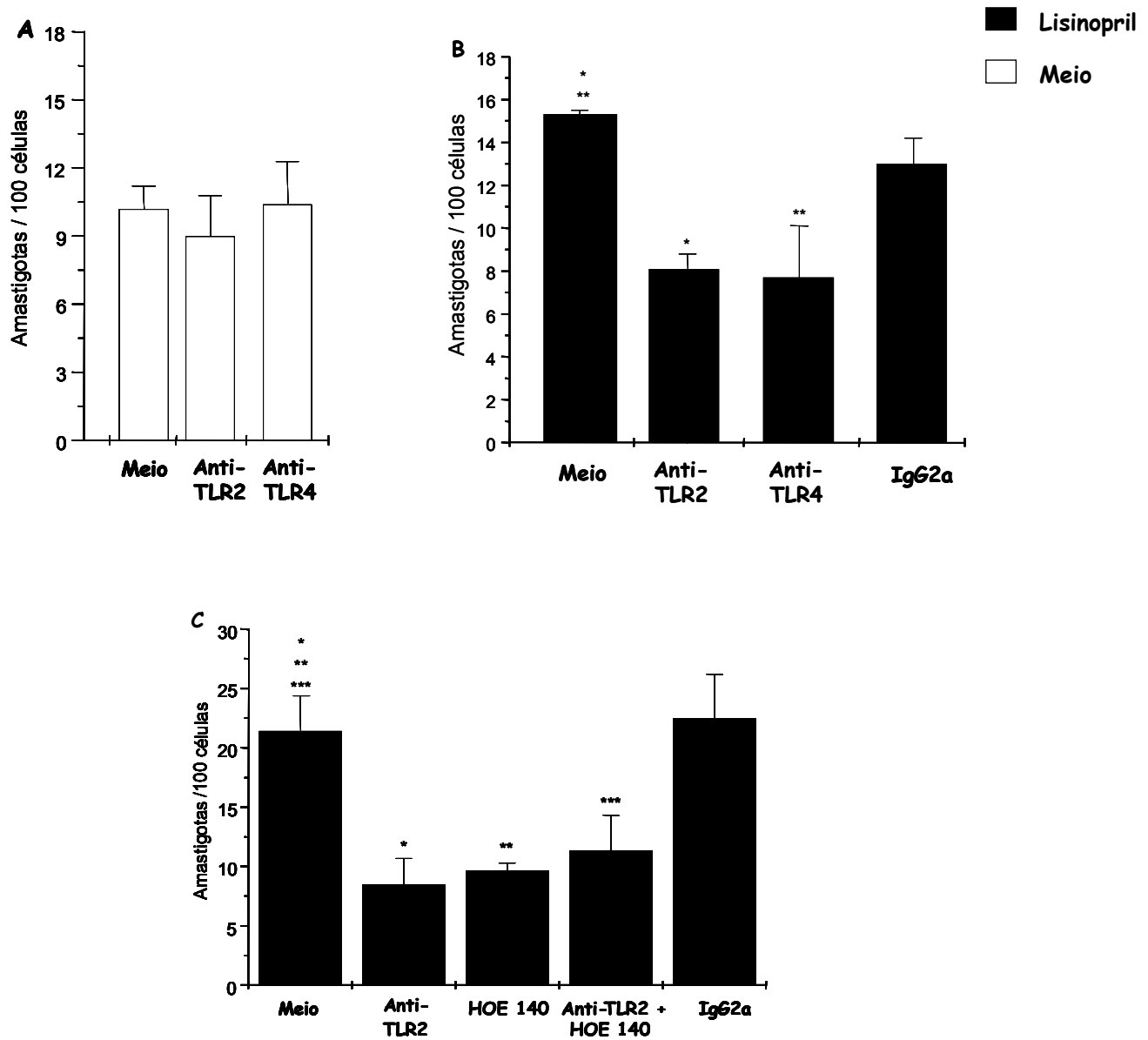
Dados preliminares obtidos durante minha tese de mestrado demonstram que o parasita é capaz de invadir CHO-TLR2 com mais eficiência do que CHO-controle, sendo o efeito abolido pela adição de anticorpos neutralizantes anti-TLR2.

Para avaliar se a sinalização via TLR2 contribui para o processo de invasão das HUVECs, a monocamada de células foi incubada em meio suplementado com albumina humana e/ou lisinopril. Surpreendentemente o anticorpo anti-TLR2 só foi capaz de reduzir as taxas de invasão de HUVECs em culturas suplementadas por inibidores da ECA (em torno de 50%), ou seja, em condições que favorecem o acúmulo de cininas e consequentemente promovendo ativação de B<sub>2</sub>R (Figura 9A e 9B). Experiências realizadas com anticorpo anti-TLR4 mostram efeitos semelhantes. Logo, a dependência de TLR é coordenada pela ativação de B<sub>2</sub>R.

Em seguida, nos perguntamos se a sinalização via TLRs e do receptor B<sub>2</sub> são interdependentes.

Onde indicado, adicionamos o antagonista do receptor B<sub>2</sub> (HOE 140) ou anticorpo monoclonal neutralizante contra TLR2 e o seu isotipo controle durante a interação com os TCT por 3h. Na figura 9C, os resultados mostram uma inibição de 60% na taxa de invasão das células tratadas com anti-TLR2 ou HOE140 quando comparadas com o controle, não sendo observado nenhum efeito nas células tratadas com o isotipo controle. É importante destacar que a adição conjunta de HOE 140 e anti-TLR2 nas culturas suplementadas com lisinopril não tem efeitos inibitórios aditivos, sugerindo que os receptores B<sub>2</sub>R e TLR2 formam um subconjunto funcional, ou seja, atuam de maneira interdependente durante a invasão dos TCT em HUVECs (figura 8C). Entretanto, vale ressaltar que a cooperação entre esses receptores ocorre somente na presença do inibidor da ECA.

HUVEC  
"repouso"

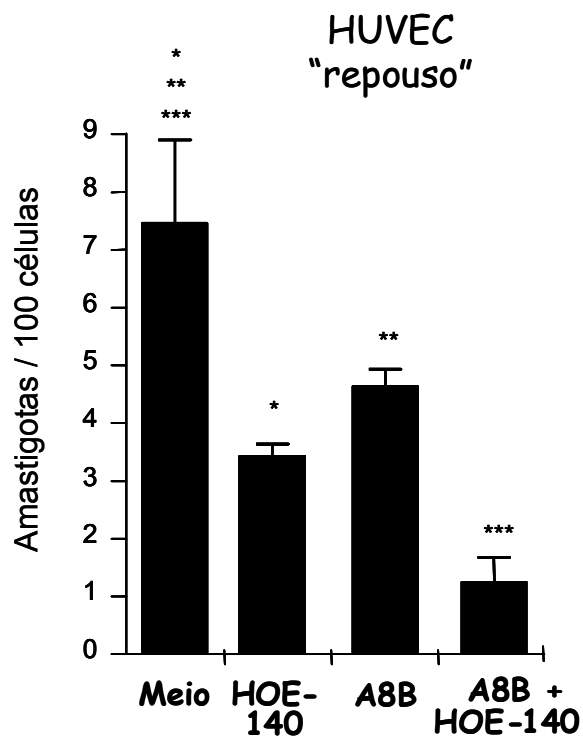


**Figura 9 - Cooperação entre B<sub>2</sub>Rs e TLR2**

HUVECs foram incubadas por 3h com TCT Dm28c na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) em meio M199 suplementado com albumina humana, na ausência ou presença de lisinopril. Onde indicado, foi adicionado ou 0,1µM de HOE 140 ou 1µg/ml do anticorpo anti-TLR2 ou 1µg/ml do anticorpo anti-TLR4 ou 1µg/mL do anticorpo isotipo controle IgG2a. A interação celular procedeu por 3 h a 37°C. Após esse tempo, as células foram lavadas, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=4)

## 5.6 – Vias de sinalização independentes: B<sub>2</sub>Rs e C5aR

Na seção anterior demonstramos que os mecanismos de invasão em HUVECs depende de um “*cross-talk*” entre C5aR e ETbR. Para avaliar a possibilidade de convergência entre as vias de cinina (B<sub>2</sub>R) e a via de C5aR, a monocamada de HUVECs foi incubada com o antagonista específico para o receptor de C5a (A8B) sozinho ou em conjunto com o antagonista para os receptores B<sub>2</sub> de cinina (HOE-140) durante a interação com os tripomastigotas por 3h. Os dados corroboram experiências anteriores que mostram que o parasita é capaz de invadir células endoteliais através da ativação dos receptores B<sub>2</sub>R e C5aR, já que observamos inibição de 53% e 34% da infecção na presença dos antagonistas seletivos de B<sub>2</sub>R (HOE-140) e C5aR (A8B) respectivamente. Porém, a adição conjunta dos dois antagonistas possui efeito inibitório aditivo (inibição de 80%), sugerindo que as sinalizações ativadas por esses receptores são distintas e complementares (Figura 10).



**Figura 10 – Vias de sinalização independentes: B<sub>2</sub>R e C5aR**

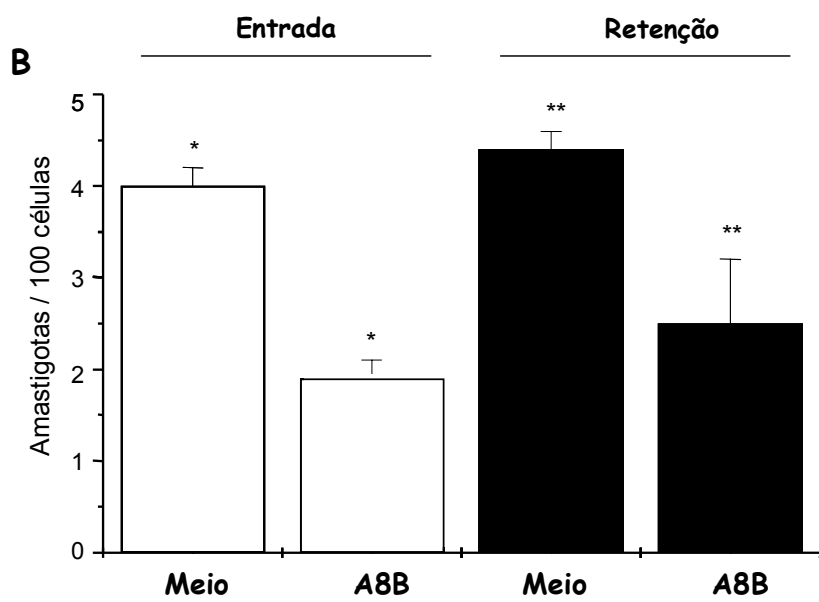
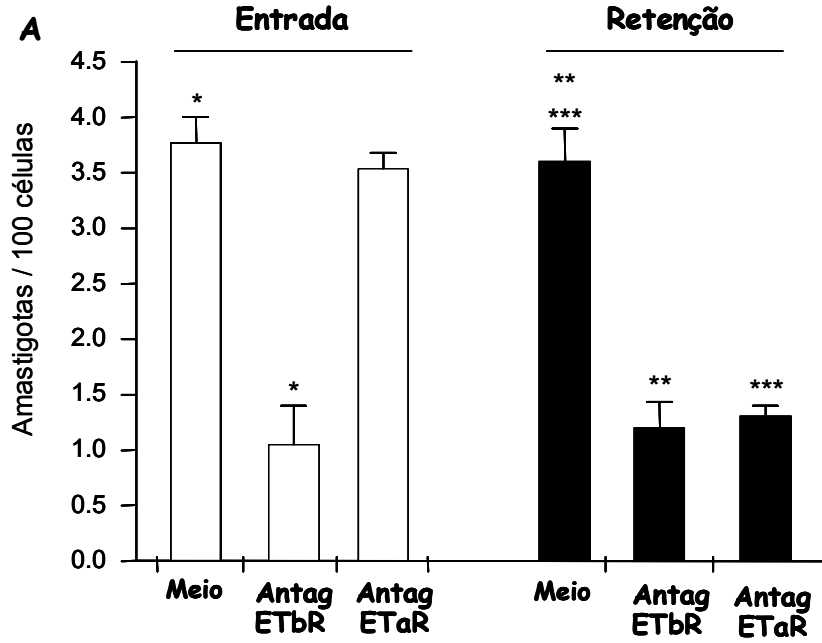
HUVECs foram incubadas por 3h com TCT Dm28c na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) em meio M199 suplementado com albumina humana e lisinopril. Onde indicado, foi adicionado 0,1 $\mu$ M de HOE 140 ou 10 nM de A8B (antagonista do C5aR). A interação celular procedeu por 3 h a 37°C. Após esse período, as células foram lavadas, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias  $\pm$  SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=3)

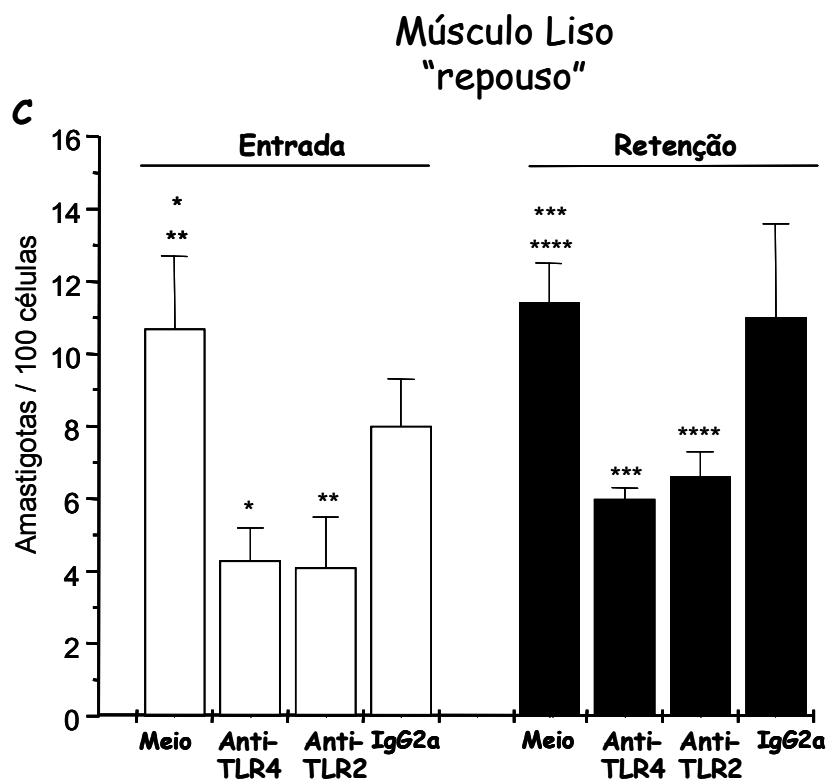
### 5.7 – Análise da contribuição diferencial de GPCRs versus TLRs nas etapas de entrada x retenção dos TCT

Em estudos recentes, CHAVES e cols. demonstraram que o *T. cruzi* invade células não-fagocíticas através de um processo que pode ser dividido em duas etapas: entrada e retenção (CHAVES *et al.*, em preparação). A entrada do parasita pode ocorrer devido a indução de uma via  $Ca^{+2}$ -dependente e que requer a fusão dos lisossomos com a membrana plasmática da célula hospedeira. Além dessa via, outros estudos sugerem que o parasita pode provocar a invaginação da membrana plasmática (via lisossomo independente), e ambas dependentes da ativação de PI3-K em etapas diferentes (WOOLSEY *et al.*, 2003). Uma vez internalizado no vacúolo parasitóforo, o parasita emite sinais de retenção, PI3K dependentes, que promovem a fusão do vacúolo com os lisossomos (ANDRADE e ANDREWS, 2004).

Baseado nessas informações fomos analisar quais receptores estariam envolvidos na entrada e retenção dos tripomastigotas na célula hospedeira. Para isso, realizamos ensaios de interação do parasita com a célula de músculo liso humano, em repouso, em tempos curtos (10 minutos) e as culturas eram fixadas ou mantidas por mais 40 minutos adicionais, para permitir avaliar a retenção posterior (Figura 11). Podemos observar a participação de C5aR (Figura 11B), TLR2, TLR4 (Figura 11C) e ETbR na entrada, enquanto os ETaRs são importantes para a retenção do parasita na célula hospedeira (Figura 11A).

Músculo Liso  
"repouso"





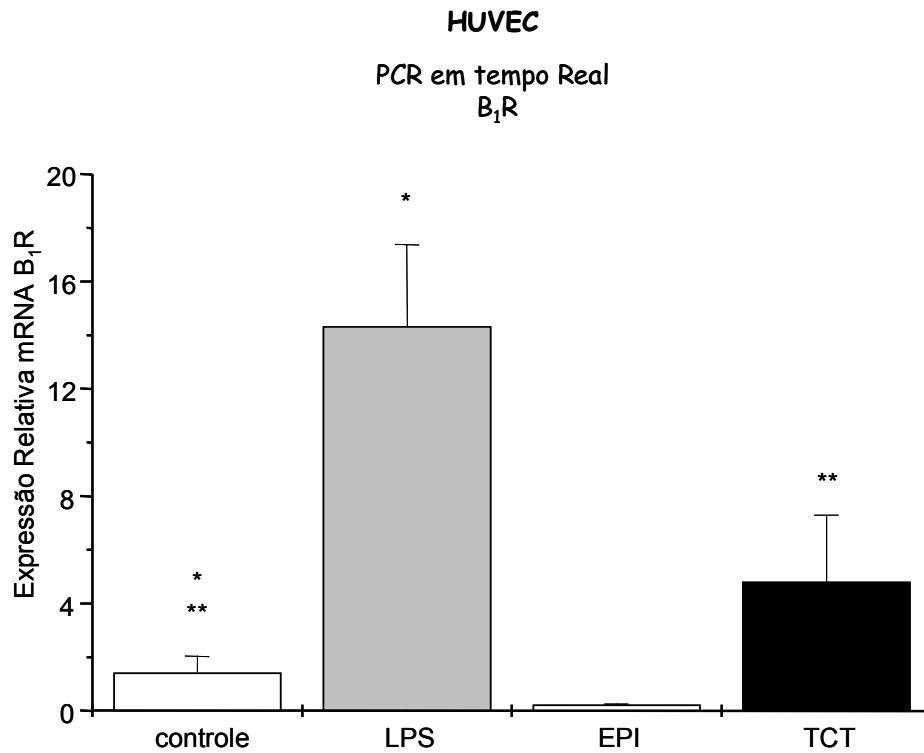
**Figura 11- Receptores envolvidos na entrada x retenção dos TCT na célula hospedeira**

Células de músculo liso humano foram lavadas e incubadas por 3h com TCT Dm28c na proporção de 20:1 (parasita:célula hospedeira) em meio DMEM suplementado com albumina humana. Os ensaios foram realizados em volume de 100µl, com adição dos tripomastigotas diretamente sobre a monocamada de células, durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, a monocamada de células foi lavada várias vezes para a retirada dos parasitas não internalizados ou não aderidos, e incubadas por mais 10 minutos, em meio DMEM suplementado com albumina humana a 37°C. Para retenção, as células foram incubadas por mais 40 minutos a 37°C. As lamínulas foram fixadas em solução Bouin nos tempos de 20 minutos e 60 minutos de interação, coradas com Giemsa. Para discriminar a participação dos receptores envolvidos na entrada e retenção dos parasitas na célula hospedeira as células receberam tratamento com 1µM do antagonista de ETaR ou com 10µM do antagonista de EtbR (Figura 11A) ou com anticorpos anti-TLR2 (1µg/ml) ou anti-TLR4 (1µg/ml) (Figura 11C) ou com A8B (10 nM) (Figura 11B). O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais (n=4).



## **5.8 – Ativação de células endoteliais pelos TCT Dm28c**

Durante minha tese de mestrado foi demonstrado que as tGPI-mucinas, ligantes de TLR2, liberadas das vesículas secretadas pelos TCT, são capazes de induzir a expressão de B<sub>1</sub>R em HUVECs, tornando as células mais susceptíveis à invasão pela via B<sub>1</sub>R/ cininase I, por um mecanismo dependente da ativação de NF-κB. Para avaliar a capacidade do TCT de induzir a expressão de B<sub>1</sub>R no endotélio, as HUVECs foram incubadas por 2h na presença de TCT Dm28c (10:1) por 2h ou LPS (1 µg/ml) ou epimastigotas e avaliamos através do PCR em tempo real os níveis de RNAm para o receptor B<sub>1</sub>R. Observamos um aumento 10x maior da expressão de bandas do receptor B<sub>1</sub> de bradicinina nas células tratadas com LPS e 2,5x maior nas células tratadas com TCT quando comparados com a célula controle (repouso) O epimastigota foi utilizado como controle negativo demonstrando que somente o tripomastigota possui essa capacidade indutora pró-inflamatória (Figura 12).



**Figura 12 - Tripomastigotas de *T. cruzi* induzem aumento na transcrição de B<sub>1</sub>R**

HUVECs foram plaqueadas a uma densidade de 10<sup>6</sup> células/poço em meio M199 suplementado com 10% SFB e foram cultivadas por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO<sub>2</sub>. As células foram ativadas ou não com LPS (1µg/mL), TCT Dm28c (10:1- parasita:célula) ou epimastigotas (10:1- parasita:célula) por 2h em meio M199-10% FCS. Após esse período o RNA foi extraído com o Kit RNAgents total RNA isolation system, Promega (vide metodologia) e foram submetidas ao PCR em tempo real. O gráfico representa a expressão do gene B<sub>1</sub>R relativo à expressão do gene TBP. (n=1)

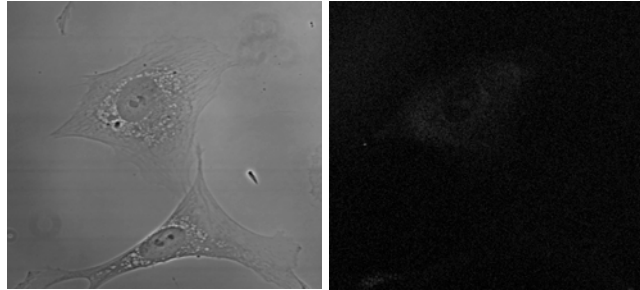
Tendo em vista que os TCT Dm28c são capazes de induzir aumento no número de cópias de RNAm para os receptores B<sub>1</sub> em HUVECs, decidimos investigar se esse aumento também se traduz na expressão desses receptores na superfície celular.

Observamos que, após o período de 2h, o estímulo com tGPI-mucina (10 nM), TCT Dm 28c (10:1) ou após 6h de estímulo com LPS (5 ng/ml) foi capaz de promover a indução de B<sub>1</sub>R detectável por imunofluorescência nas HUVECs. Como controle de especificidade do anticorpo utilizamos o peptídeo bloqueador para o receptor B<sub>1</sub>R e não são observados níveis detectáveis de expressão de B<sub>1</sub>R na superfície celular. Cabe mencionar que as HUVECs em repouso não expressam B<sub>1</sub>R na superfície.

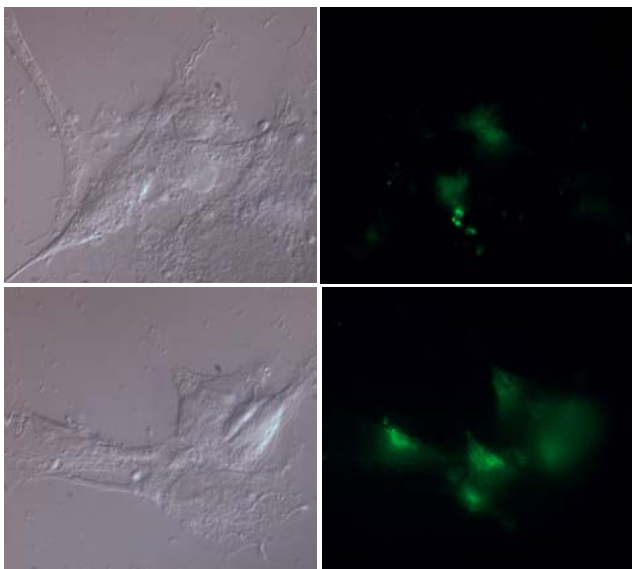
Para avaliar se o contato parasita-célula hospedeira é essencial para induzir a expressão do receptor na superfície, utilizamos o meio condicionado dos TCT como estímulo para as células endoteliais. Como podemos observar o estímulo com o meio condicionado também foi capaz de aumentar a expressão de B<sub>1</sub>R na superfície celular, sugerindo um papel crucial das moléculas secretadas em vesículas solúveis pelos tripomastigotas (Figura 13).

HUVEC / IF  
Anti-B<sub>1</sub>R

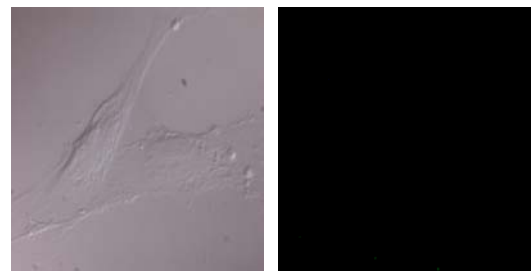
**A** Meio



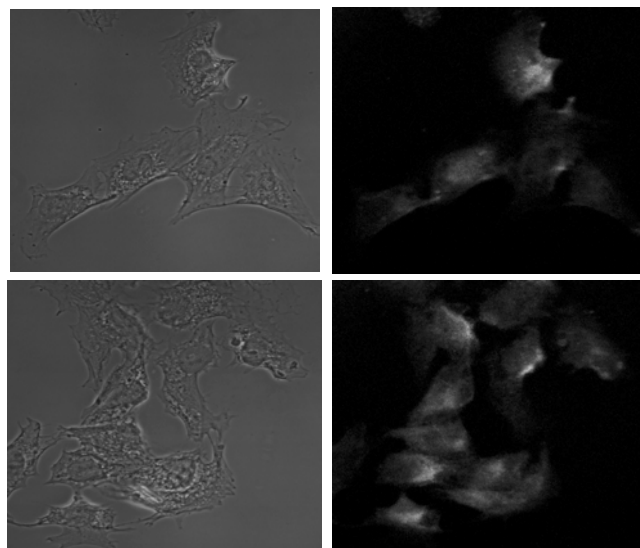
**B** TCT Dm 28c / 2h



**C** TCT Dm28c + Peptídeo Bloqueador

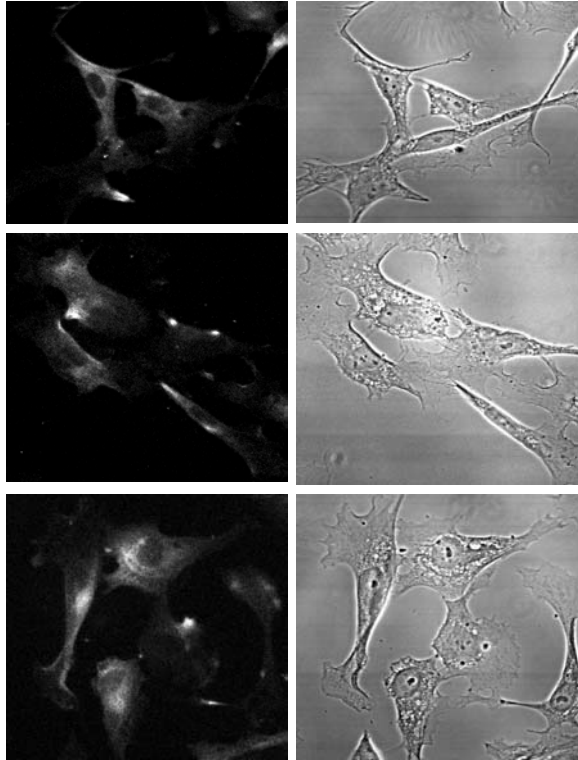


**D** Meio condicionado de TCT Dm 28c / 2h

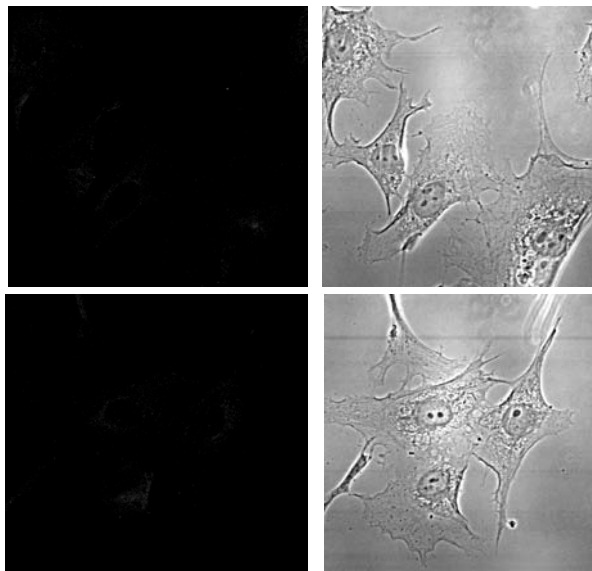


# HUVEC / IF Anti-B<sub>1</sub>R

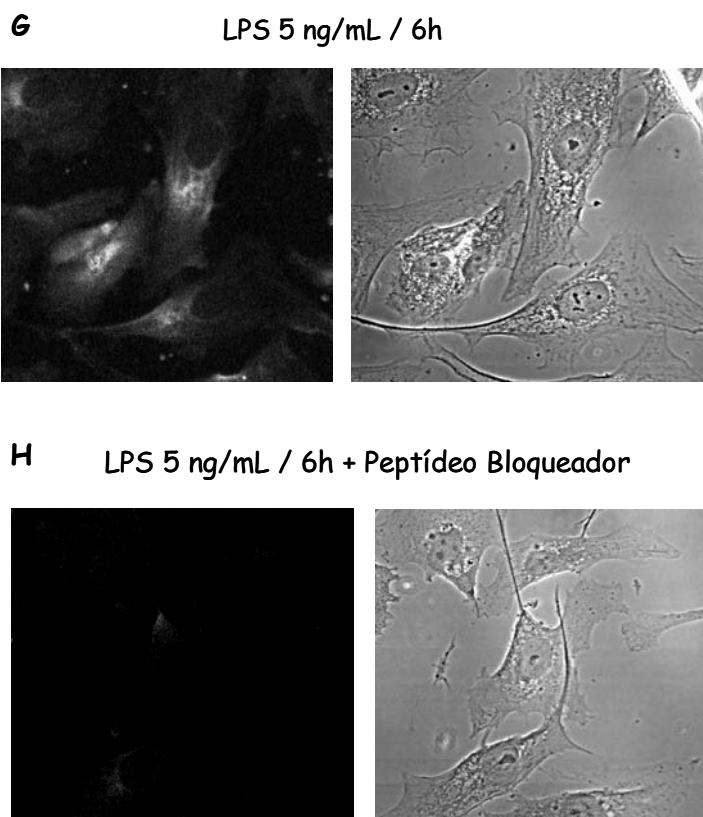
**E** †GPI-mucina 10nM / 2h



**F** †GPI-mucina 10nM / 2h +  
Peptídeo Bloqueador 10ug/ml / 1h



## HUVEC / IF Anti-B<sub>1</sub>R

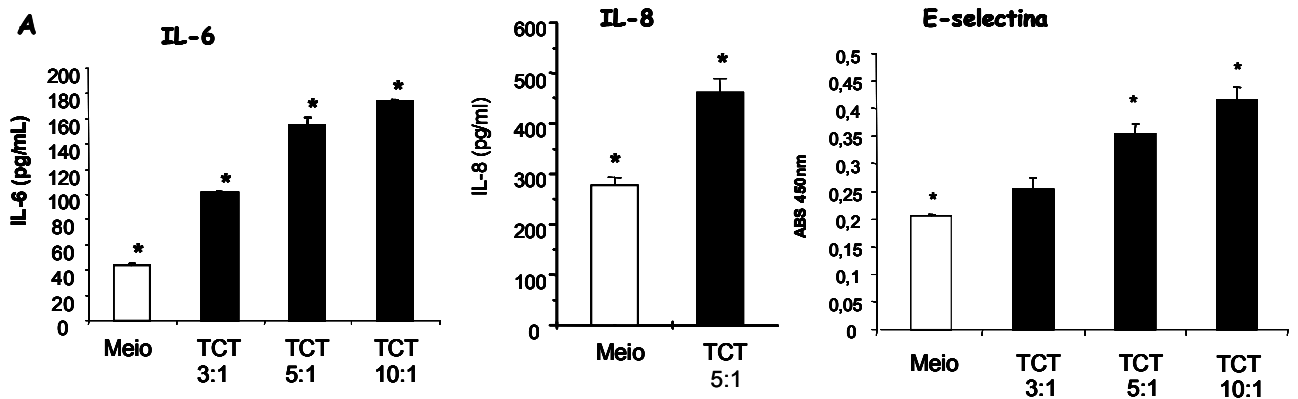


### Figura 13 – Indução de B<sub>1</sub>R em HUVECs ativadas com TCT

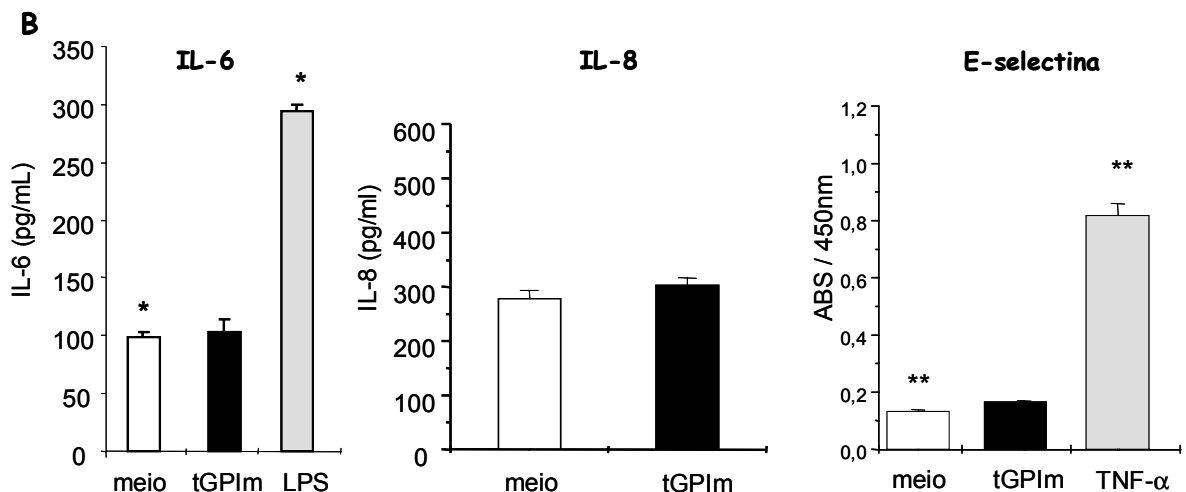
HUVECs foram plaqueadas a uma densidade de  $10^5$  células/poço em meio M199 suplementado com 10% de SFB por 48 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram incubadas por 2 horas em (A) Meio M199 com 10% SFB, ou estimuladas com (B) TCT Dm28c na proporção de 10:1 (parasita:célula hospedeira) (C) e incubados com peptídeo bloqueador ou (D) meio condicionado de TCT Dm28c (E) tGPI-mucina (10nM) (F) e incubados com peptídeo bloqueador (G) LPS 5ng/mL / 6h (H) e incubados com peptídeo bloqueador. Em seguida, as células foram lavadas e fixadas em paraformaldeído 4%. As monocamadas foram incubadas overnight com o anticorpo primário anti-B<sub>1</sub>R humano (1:100) ou anti-B<sub>1</sub>R + peptídeo bloqueador (que foi previamente incubado por 1h com anti-B<sub>1</sub>R na concentração final de 10µg/mL - C, F e H). No dia seguinte, a monocamada de células foi incubada por 1h no anticorpo secundário anti-rabbit-FITC (Sigma (1:100)). As imagens foram analisadas no Microscópio de Fluorescência Axiovert.

Tendo em vista a capacidade pró-inflamatória dos parasitas decidimos avaliar os parâmetros de ativação da célula endotelial induzido pelos TCT. Para isso realizamos ensaios de ELISA para quantificar a produção de citocinas como IL-6, a quimiocina IL-8 e a molécula de adesão E-selectina após 18h de estímulo das células com TCT (Figura 14A) ou tGPI-mucina (Figura 14B). Podemos observar que a produção de IL-6, IL-8 e a expressão de E-selectina é aumentada de forma dose-dependente após os estímulos com TCT Dm28c. No entanto essa ativação não é dependente da tGPI-mucina.

HUVEC / ELISA  
TCT



tGPI-mucina



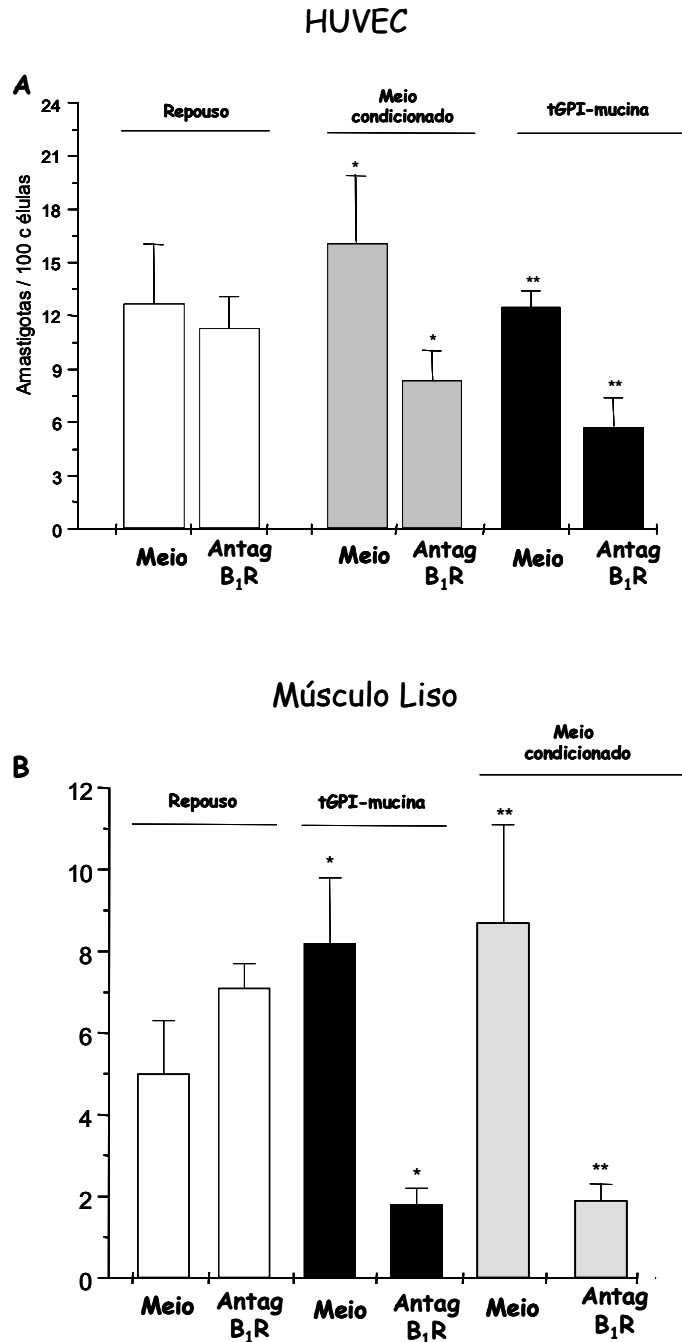
**Figura 14 – Ativação de HUVECs pelos TCT Dm28c**

HUVECs foram plaqueadas conforme descrito na metodologia. Após 48h, as células foram incubadas apenas meio com 10% SFB estimuladas ou não com (A) TCT Dm28c por 3h na proporção parasita:célula indicado ou 10 nM de tGPI-mucina por 2h. Após esse tempo, as células foram lavadas 3x em HBSS e foi adicionado meio contendo 10% SFB. Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos após 18h, centrifugados (850 x g por 5 min a 4°C) para remoção dos parasitas e congelados para posterior análise da quimiocina IL-8 e da citocina IL-6. (B) HUVECs foram estimuladas ou não com 10nM de tGPI-mucina ou TCT Dm28c na proporção especificada de parasita:célula por 6h na presença de meio suplementado com 10% SFB. Após esse tempo, as células foram fixadas em 1% de paraformaldeído, bloqueada com 5% de leite e incubadas no anticorpo anti-E-selectina. Após 2 horas as células foram incubadas no anticorpo secundário anti-mouse conjugado a peroxidase por 1h. Após lavagem, o substrato BD Opteia foi adicionado por 30 minutos e a reação foi paralisada em 2N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O ELISA foi lido na absorbância de 450nm. As diferenças estatísticas com significância de p<0.05 estão marcadas com asteriscos iguais. (n=3)



Assim como a tGPI-mucina purificada, o meio condicionado de TCT é capaz de induzir a expressão do receptor  $B_1$  na superfície celular, avaliamos se os TCT são capazes de ativar essa via de sinalização durante o processo de invasão das células endoteliais e musculares.

Sobrenadantes gerados a partir da secreção de TCT Dm28c (barras pretas) ou tGPI-mucina (barras cinzas) foram incubados por 2h em meio M199-10% de SFB para ativação da célula hospedeira. Após esse período os tripomastigotas foram adicionados ao meio de infecção contendo lisinopril, na presença ou ausência do antagonista de  $B_1R$  por 3h. Foi possível observar que houve inibição de 45% na invasão das células endoteliais (Figura 15A) e de 75% em HSMCs (Figura 15B) pré-tratadas com o meio condicionado na presença do antagonista de  $B_1R$ , demonstrando a capacidade pró-inflamatória do sobrenadante em induzir o receptor  $B_1R$  na célula hospedeira mamífera, assim como a molécula purificada do parasita (tGPI-mucina) (Figura 13). Consistente com os resultados anteriores, demonstramos que a tGPI-mucina purificada, assim como o meio condicionado induzem a expressão de  $B_1R$  e permitem a ativação dessa via como uma nova rota de invasão dos parasitas nas células endoteliais e musculares.

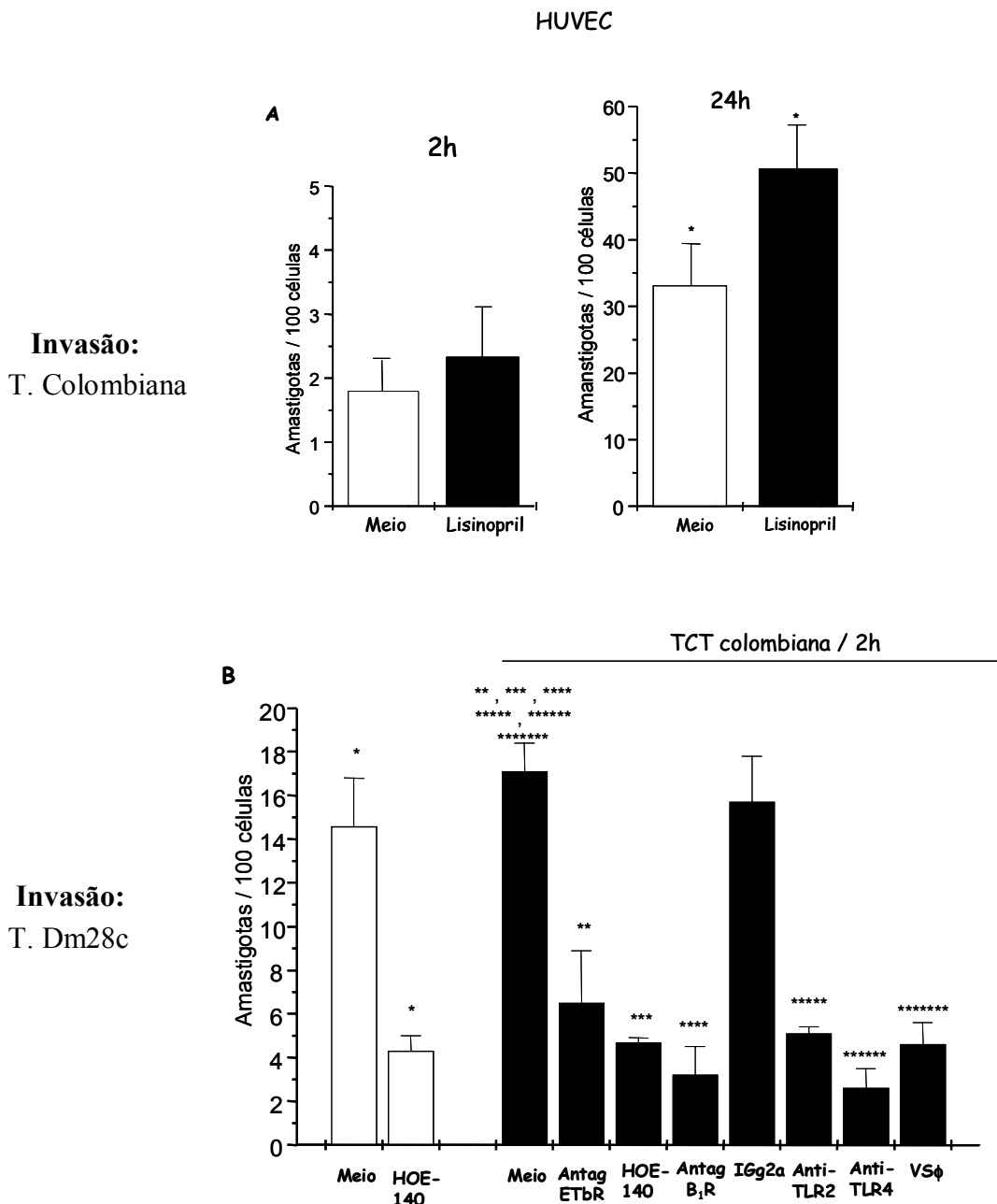


**Figura 15 – Invasão de HUVECs e HSMCs por tripomastigotas de *T. cruzi* via B<sub>1</sub>R**  
 (A) HUVECs e células de músculo liso humano (B) foram incubadas com meio (barras brancas) ou com meio condicionado de TCT (barras cinzas) ou tGPI-mucina (10nM em HUVECs ou 25nM em HSMCs) (barras pretas) durante 2 horas em meio suplementado com 10% de SFB. Após esse período, as células foram lavadas, os TCT Dm28c foram adicionados na proporção 5:1 (parasita:célula hospedeira) na presença ou ausência de [Leu]<sup>8</sup>-des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> (1μM). A interação celular procedeu por 3 h a 37°C na presença de lisinopril (25μM) em meio M199 suplementado com albumina humana. Após 3h, as células foram lavadas, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de p<0.05 estão marcadas com asteriscos iguais. (n=6)

### **5.9 – TCT Colombiana são capazes de ativar HUVECs, sinalizando invasão celular pela via B<sub>1</sub>R/TLR2/4**

Tendo evidenciado que a cepa colombiana apresenta-se com baixa infectividade, (em torno de 2% de infecção) após 2h, se comparada com a cepa Dm28c (em torno de 20%). Decidimos utilizar essa cepa como uma ferramenta para indução do receptor B<sub>1</sub>R, a fim de mimetizar o efeito de inflamação, assim como descrito anteriormente com a tGPI-mucina e o meio condicionado dos TCT Dm28c. Especulamos que essas diferenças nos níveis de infectividade sejam devido a um atraso na maturação enzimática ou em diferenças de adesividade que atrasam sua penetração na célula hospedeira, já que após 24 horas observa-se uma taxa em torno de 30% de infecção, que é potencializada na presença do lisinopril (50%) (Figura 16A).

No entanto, podemos notar que a incapacidade infectiva da cepa colombiana não se deve à ausência de fatores que contribuem para a invasão do parasita, já que os TCT colombiana são capazes de ativar células endoteliais induzindo a expressão de B<sub>1</sub>R e sugerindo a presença de cruzipaina e ligantes de TLR2 e possivelmente TLR4 nesses sobrenadantes. A invasão da cepa Dm28c ocorre mediante ativação dos receptores ETbR, B<sub>2</sub>R, B<sub>1</sub>R, TLR2 TLR4, sendo dependente da atividade da cisteíno-protease (Figura 16B). Considerando a grande heterogeneidade das cepas de *T. cruzi* essas observações são relevantes no contexto de infecções naturais, onde o hospedeiro mamífero pode estar exposto simultaneamente a diferentes cepas do parasita.

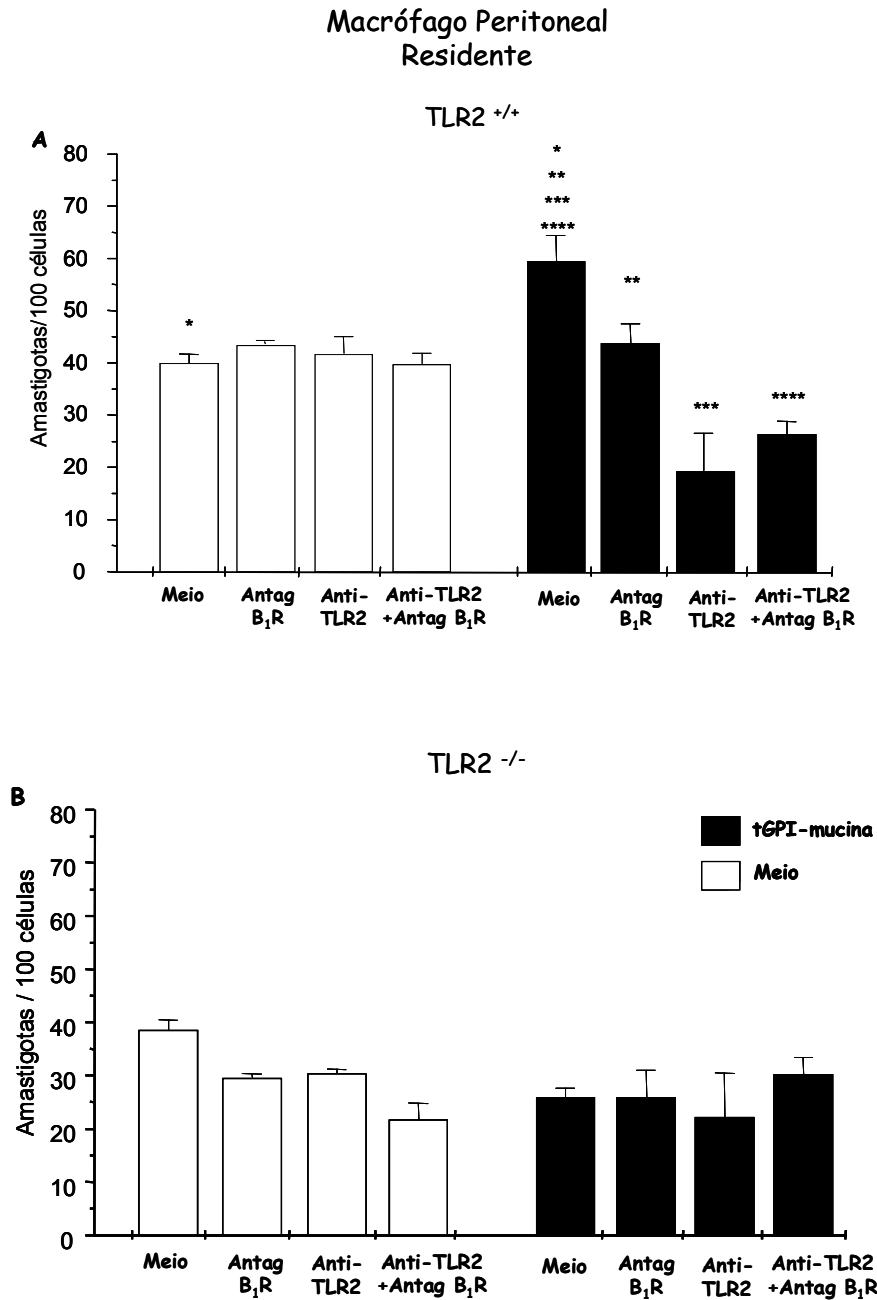


**Figura 16 – Estímulo por 2h com a cepa colombiana cria uma nova rota de entrada para o TCT Dm28c via B<sub>1</sub>R**

(A) HUVECs em repouso foram incubadas por 2h ou 24h com TCT colombiana na proporção de 20:1 (parasita:célula hospedeira) em meio M199 suplementado com albumina humana, na presença ou ausência de lisinopril. (B) HUVECs em repouso foram incubadas (barras pretas) ou não (barras brancas) por 2 horas com TCT colombiana em meio suplementado com 10% de SFB. Após esse período, as células foram lavadas, os TCT Dm28c foram adicionados na proporção 5:1 (parasita:célula hospedeira). Onde indicado foi adicionado 0,1μM de HOE 140 (antagonista seletivo do receptor B<sub>2</sub>) ou 100 nM de A8B (antagonista do C5aR) ou 1μM de [Leu]<sup>8</sup>-des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub>) ou 10 μM de BQ-788 (antagonista de ETbR) ou 10μM de VSφ ou 1μg/mL de anti-TLR2 ou anti-TLR4 ou seu isotipo controle IgG2a. A interação celular procedeu por 3 h a 37°C. Após esse período, as células foram lavadas, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de p<0.05 estão marcadas com asteriscos iguais. (n=2)

### **5.10 - Indução do receptor B<sub>1</sub>R pela tGPI-mucina: Participação da via de sinalização do receptor TLR2**

Considerando que a tGPI-mucina ativa TLR2 em macrófagos murinos (CAMPOS *et al.*, 2001), nos perguntamos se a indução do B<sub>1</sub>R pela tGPI-mucina no nosso modelo seria dependente da ativação de TLR2. A fim de avaliar a participação de TLR2 na indução do B<sub>1</sub>R pela tGPI-mucina, realizamos ensaios de invasão utilizando macrófagos peritoneais residentes obtidos de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para TLR2. Para isso, pré-incubamos os macrófagos TLR2<sup>+/+</sup> e TLR2<sup>-/-</sup> com tGPI-mucina por 2h em meio suplementado com 10% SFB. Após esse período as células foram lavadas e os tripomastigotas foram adicionados à monocamada de células na presença ou ausência do [Leu]<sup>8</sup>-des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista de B<sub>1</sub>R) e/ou anticorpo neutralizante anti-TLR2 e podemos observar que a tGPI-mucina foi capaz de induzir B<sub>1</sub>R em macrófagos selvagens já que houve um aumento de 2x na infecção dos macrófagos pré-tratados com tGPI-mucina e uma inibição de 65% na entrada desses parasitas em macrófagos tratados com tGPI-mucina e antagonista de B<sub>1</sub>R. No entanto, a tGPI-mucina foi incapaz de induzir o receptor B<sub>1</sub>R em macrófagos obtidos de camundongos nocautes, evidenciando a necessidade da ativação de TLR2 pela tGPI-mucina para indução do receptor B<sub>1</sub>R. A adição conjunta do antagonista de B<sub>1</sub>R e anti-TLR2 não mostram efeitos inibitórios aditivos, indicando uma cooperatividade entre esses receptores para a entrada do parasita nessas células (Figura 17).

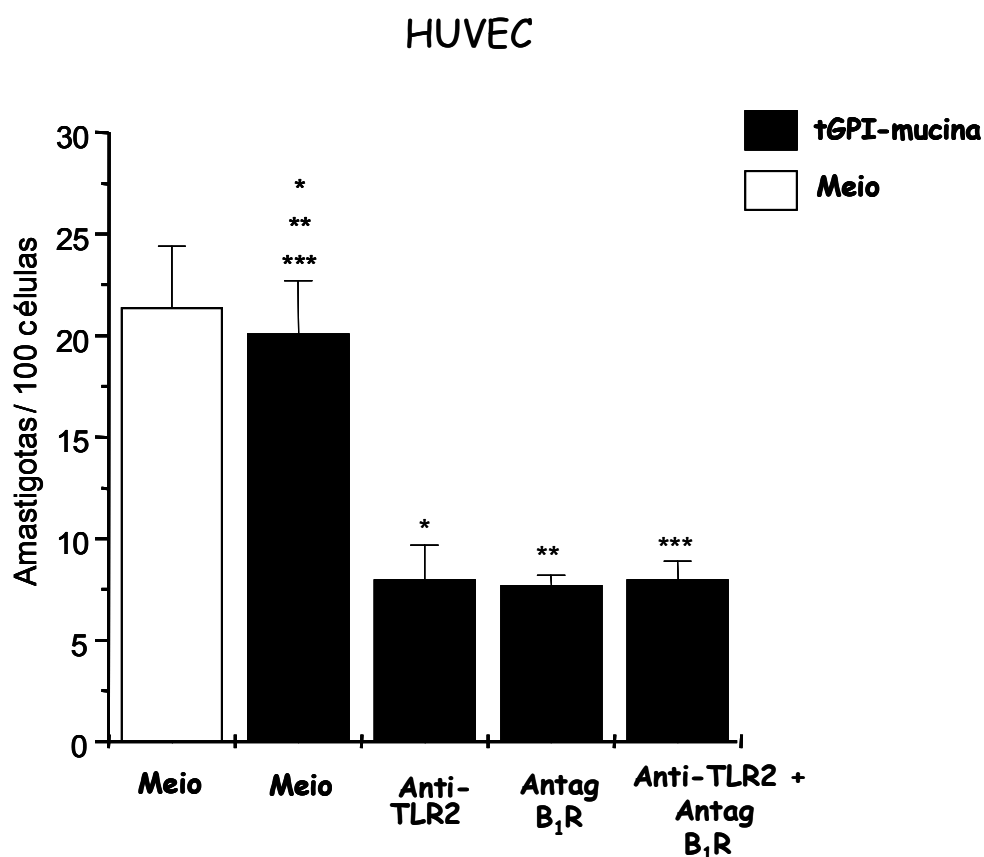


**Figura 17 – Participação de TLR2 na indução de B<sub>1</sub>R pela tGPI-mucina**

Macrófagos peritoneais residentes obtidos de camundongos C57BL/6 selvagens (TLR2<sup>+/+</sup>) e nocautes para TLR2 (TLR2<sup>-/-</sup>) foram estimulados ou não com tGPI-mucina (10nM) por 2 horas. Após esse período, as células foram lavadas e os TCT Dm28c foram adicionados na proporção 3:1 (parasita:célula). Quando indicado, adicionou-se [Leu]<sup>8</sup>-des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista seletivo de B<sub>1</sub>R (1μM) e/ou anticorpo monoclonal neutralizante contra o receptor TLR2 (1μg/mL) momentos antes da interação. Após 3 horas na presença de lisinopril (25μM) em meio M199-albumina, as células foram lavadas, fixadas com Bouin e coradas por Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de p<0.05 estão marcadas com asteriscos iguais. (n=2)

### **5.11 – Envolvimento do subconjunto B<sub>1</sub>R / TLR2 na invasão de HUVECs “pré-ativadas”**

A interdependência de sinalização entre as vias B<sub>1</sub>R e B<sub>2</sub>R de cininas já foi demonstrada em células de tumores de próstata (BARKI-HARRINGTON *et al.*, 2003). De acordo com esses dados e trabalhos anteriores do nosso grupo sobre evidências de cooperação entre receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> *in vitro* (TODOROV *et al.*, 2003) e TLR2 e B<sub>2</sub> *in vivo* (MONTEIRO *et al.*, 2006) e *in vitro* (Figura 9C), nos perguntamos se a sinalização via TLRs afetava o engajamento do receptor B<sub>1</sub> pelos parasitas. A presença do antagonista de B<sub>1</sub>R em culturas de células pré-ativadas com tGPI-mucina na presença de anti-TLR2 ou antagonista de B<sub>1</sub>R resultam em 60% de inibição da invasão. Além disso, a adição conjunta do antagonista de B<sub>1</sub>R e anti-TLR2 não mostram efeitos aditivos, sugerindo também a cooperação entre essas vias de sinalização B<sub>1</sub>R/TLR2 (figura 18).

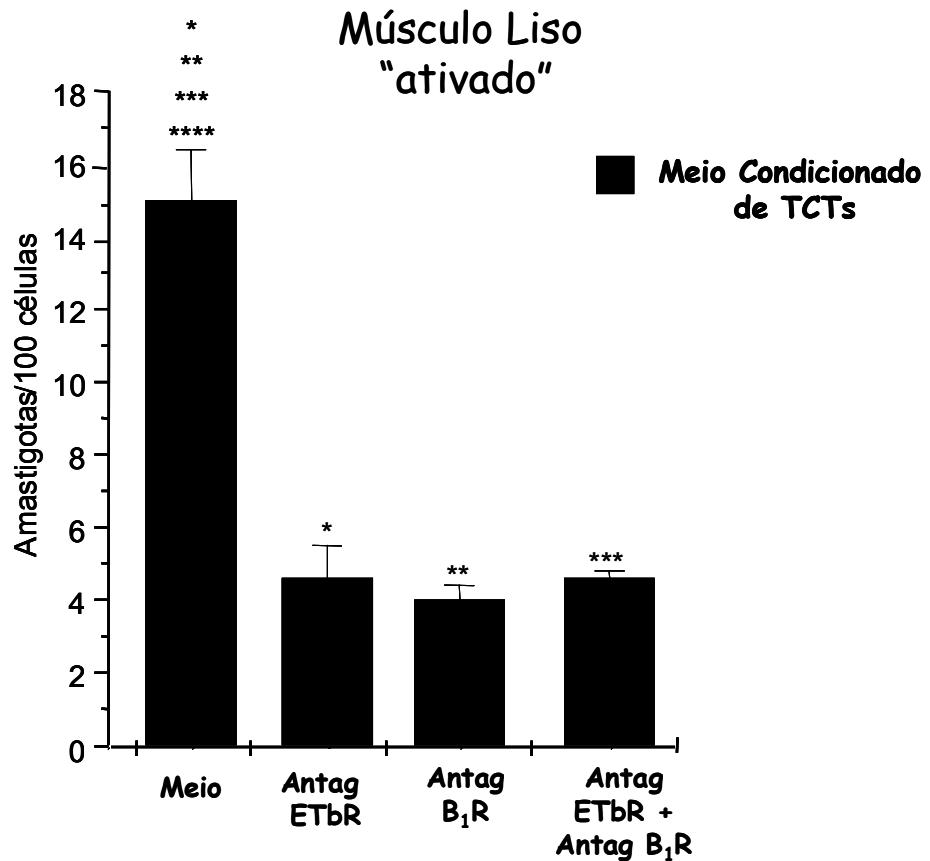


**Figura 18 –B<sub>1</sub>Rs e TLR2 controlam mecanismos interdependentes de invasão em HUVECs “pré-ativadas”**

HUVECs foram previamente incubadas (barras pretas) ou não (barras brancas) com 10 nM de tGPI-mucina por 2 h em meio M199 suplementado com 10% de SFB. Após este tempo, as células foram lavadas e incubadas por 3h com TCT Dm28c na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) em meio M199 suplementado com albumina e lisinopril. Onde indicado, foi adicionado 1 $\mu$ M de antagonista B<sub>1</sub>R ou 1 $\mu$ g/ml do anticorpo anti-TLR2. Após 3 h a 37°C, as células foram lavadas, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias  $\pm$  SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=4)



Devido às evidências anteriores de interdependência funcional entre os receptores B<sub>2</sub> e ETb (Figura 8), nos perguntamos se a sinalização via endotelina também teria efeitos cooperativos com os receptores B<sub>1</sub>. A presença do antagonista de B<sub>1</sub>R ou do antagonista de ETbR em culturas de células de músculo liso humano pré-ativadas com meio condicionado resultam em 65% de inibição da invasão. Porém a adição conjunta do antagonista de B<sub>1</sub> e antagonista de ETbR não mostram efeitos aditivos, sugerindo também a cooperatividade entre esses dois sistemas B<sub>1</sub>R/ETbR (Figura 19).

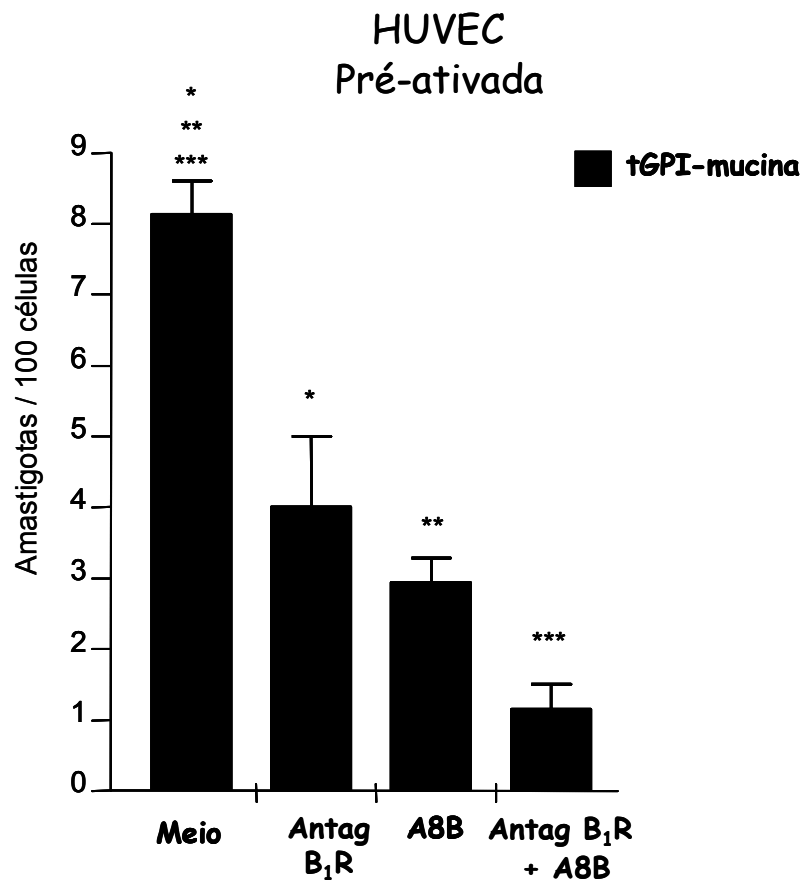


**Figura 19 - B<sub>1</sub>Rs e ETbRs controlam mecanismos interdependentes de invasão em HSMCs "ativadas"**

HSMCs em repouso foram incubadas com meio condicionado gerado por  $3 \times 10^7$  TCT Dm28c por 2h em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após esse tempo, as células foram lavadas e incubadas por 3h a 37°C com TCT na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) em meio DMEM suplementado com albumina humana. Onde indicado, foi adicionado 1µM de [Leu]<sup>8</sup>-des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista de B<sub>1</sub>R) ou 10µM de BQ-788 (antagonista de ETbR). O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais. (n=4)

### **5.12 – Vias independentes de sinalização: B<sub>1</sub>R-C5aR**

Para avaliar a convergência de sinalização em células ativadas, expressando B<sub>1</sub>R, com a via de C5aR utilizamos o antagonista específico para o receptor de C5a (A8B) sozinho ou em conjunto com o antagonista para os receptores de cinina B<sub>1</sub> em HUVECs previamente ativadas com tGPI-mucina por 2h. Os dados mostram uma inibição de 50% da invasão na presença do antagonista de B<sub>1</sub>R e de 63% na presença de A8B. O interessante é que com a adição conjunta desses antagonistas observa-se um efeito aditivo (80% de inibição), sugerindo que essas vias de sinalização atuam independentemente (Figura 20).



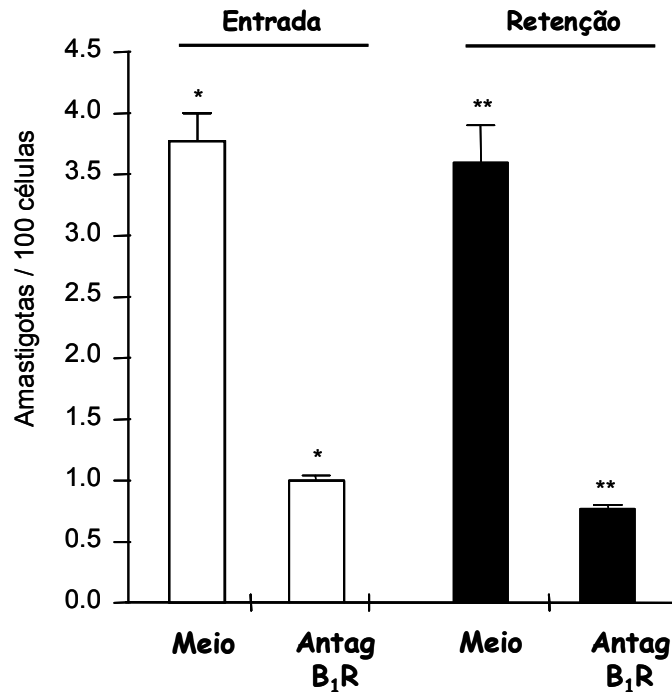
**Figura 20 – Vias independentes de sinalização: B<sub>1</sub>R-C5aR**

HUVECs foram ativadas com 10 nM de tGPI-mucina por 2h em meio M199 suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas por 3h com TCT Dm28c na proporção de 5:1 (parasita:célula hospedeira) em meio M199 suplementado com albumina e lisinopril. Onde indicado, foi adicionado 1µM de [Leu]<sup>8</sup>-des-Arg<sup>9</sup>-BK (antagonista B<sub>1</sub>R) ou 10 nM de A8B (antagonista do C5aR). Após 3 h a 37°C, as células foram lavadas, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa. O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de p<0.05 estão marcadas com asteriscos iguais (n=2).

### **5.13 – Análise da contribuição de B<sub>1</sub>R nas etapas de entrada x retenção dos TCT na célula hospedeira**

Tendo em vista a participação diferencial dos receptores ETaR e ETbR nas etapas de entrada versus retenção do parasita em HSMCs em repouso (Figura 11A), resolvemos investigar a contribuição do receptor B<sub>1</sub>R em HSMCs “ativadas”. Para isso, realizamos ensaios de interação do parasita com a célula de músculo liso humano, pré-ativadas com meio condicionado gerado a partir de TCT Dm28c, em tempos curtos (10 minutos) e as culturas eram fixadas ou mantidas por mais 40 minutos adicionais, para permitir avaliar a retenção posterior. Podemos observar a participação de B<sub>1</sub>R na etapa de entrada do parasita na célula hospedeira (Figura 21).

## Músculo Liso Pré-ativado



**Figura 21- Receptores B<sub>1</sub>R envolvidos na entrada dos TCT em HSMCs “ativadas”**

Células de músculo liso humano foram incubadas por 2h em meio condicionado gerado por  $3 \times 10^7$  TCT Dm28c em meio M199 suplementado com 10% de SFB para indução de B<sub>1</sub>R. Em seguida, as células foram lavadas e os ensaios foram realizados em volume de 100µl, com adição dos tripomastigotas diretamente sobre a monocamada de células, durante 10 minutos a 37°C. Em seguida, a monocamada de células foi lavada várias vezes para a retirada dos parasitas não internalizados ou não aderidos, e incubadas por mais 10 minutos, em meio DMEM suplementado com albumina humana a 37°C. Para retenção, as células foram incubadas por mais 40 minutos a 37°C. As lamínulas foram fixadas em solução Bouin nos tempos de 20 minutos e 60 minutos de interação, coradas com Giemsa. Para discriminar a participação de B<sub>1</sub>R na entrada e retenção dos parasitas na célula hospedeira as células receberam tratamento com 1µM do antagonista de B<sub>1</sub>R (1µM). O número de parasitas intracelulares foi determinado por contagem em microscópio óptico. O índice de infecção (médias ± SD) representa o número de amastigotas intracelulares por 100 células (em triplicata). As diferenças estatísticas com significância de  $p < 0.05$  estão marcadas com asteriscos iguais (n=4).

## 5.14 – Avaliação do papel de B<sub>1</sub>R na patogênese da cardite chagásica

Os receptores B<sub>1</sub> elicitam respostas persistentes e sinalização continuada, e essa ativação é amplificada devido ao acúmulo de des-Arg<sup>9</sup>-BK nos sítios de inflamação (DÉCARIE *et al.*, 1996; MARCEAU *et al.*, 1998). Um aumento na expressão de carboxipeptidase M (cininase I) pode também contribuir para o aumento endógeno de agonistas de receptores B<sub>1</sub> durante a inflamação (SCHREMMER-DANNINGER *et al.*, 1998; revisado por COUTURE *et al.*, 2001). A participação de B<sub>1</sub>R na patogênese de doenças crônico-inflamatórias tem sido amplamente descrita.

Para avaliar a importância de B<sub>1</sub>R na patogênese da Doença de Chagas na fase crônica, camundongos C57/BL6 selvagens e B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> TCT Dm28c na pata. Quatro meses depois, cortes histológicos do coração revelaram que os corações de camundongos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> apresentam fibrose cardíaca reduzida em comparação com os camundongos selvagens, sugerindo que B<sub>1</sub>R possa ter algum papel nesse processo (Figura 22). Estudos posteriores devem elucidar se a atenuação da fibrose no miocárdio observada nos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> é uma consequência indireta da redução do parasitismo tecidual ou pode refletir um comprometimento da imunopatologia dependente de B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, como uma deficiência de recrutamento de leucócitos para os sítios de infecção (McLEAN *et al.*, 2000) e /ou uma reduzida deposição de colágeno, uma resposta B<sub>1</sub>R dependente que em outros modelos de doença está associada com um aumento da estabilidade do RNAm para CTGF.

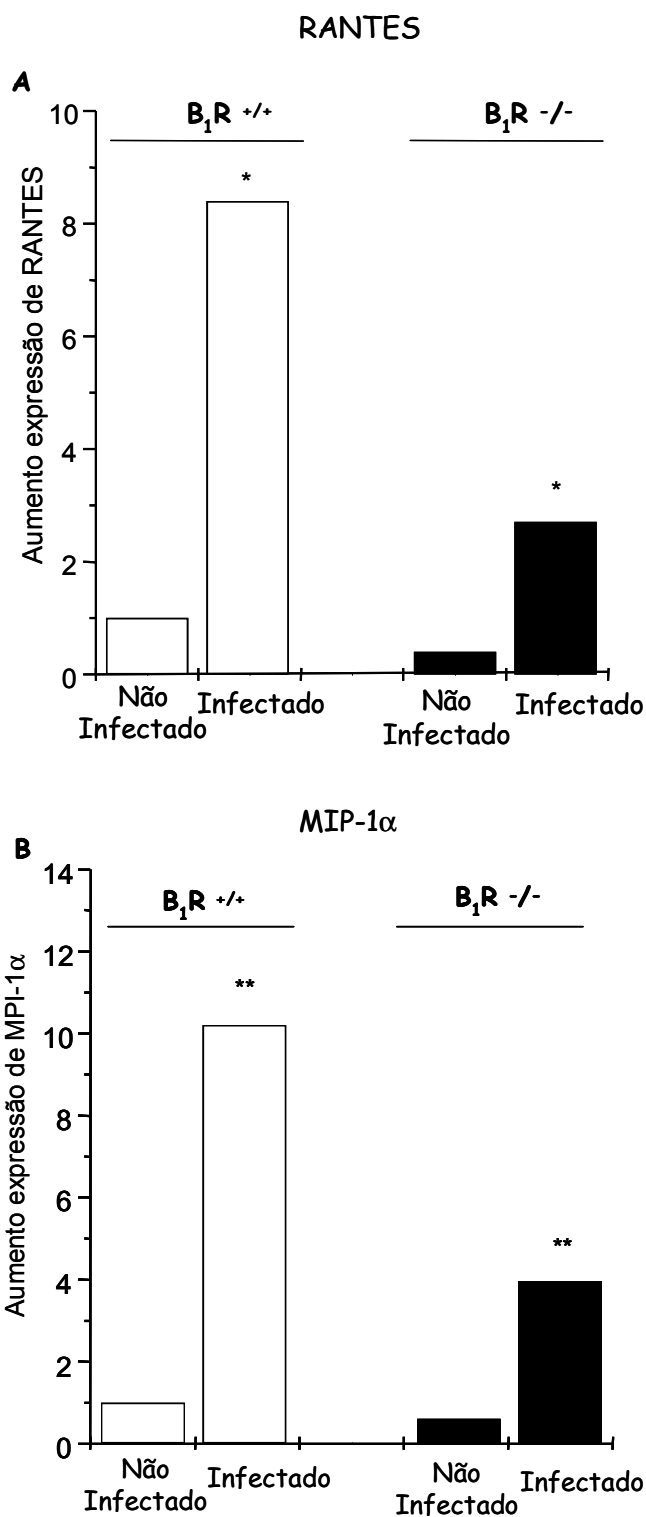
Para verificar se a resposta inflamatória foi atenuada em camundongos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>, analisamos o perfil de quimiocinas presentes no coração por PCR em tempo real. Os resultados obtidos demonstram que os corações de camundongos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> possuem menor expressão das quimiocinas RANTES e MIP-1 $\alpha$  quando comparados com os selvagens (Figura 23).



**Figura 22 - Fibrose reduzida no miocárdio de camundongos  $B1R^{-/-}$  4 meses p.i.**

Camundongos C57BL/6 selvagens ( $B_1R^{+/+}$ ) ou C57BL/6  $B_1R^{-/-}$  fêmeas foram infectados ou não com  $10^6$  TCT na pata. Após 4 meses de infecção, os camundongos (4 animais por grupo) foram sacrificados e os corações coletados. Os corações, embebidos em OCT, foram cortados em secções de  $7\mu\text{m}$  e corados com H&E ou Picrosirius para detecção da fibrose. Os resultados demonstram que os  $B_1R^{-/-}$  têm uma menor deposição de colágeno, indicando fibrose reduzida quando comparados com os selvagens (n=2).





**Figura 23- Diminuição da expressão das quimiocinas RANTES e MIP-1 $\alpha$  nos corações de camundongos  $B_1R^{-/-}$**

Análise dos níveis de expressão das quimiocinas RANTES e MIP1- $\alpha$  nos corações de camundongos C57/BL6 selvagens e  $B_1R^{-/-}$  cronicamente infectados ou não com  $10^6$  TCT de *T. cruzi* Dm28c. O RNA desses corações foi extraído com TRIZOL<sup>®</sup> (vide metodologia) e submetido ao PCR em tempo real. O controle interno foi feito com GAPDH. Os resultados demonstram uma diminuição nos níveis de expressão de quimiocinas nos camundongos  $B_1R^{-/-}$  quando comparados com os selvagens (n=1).

## 6 – Discussão

Nessa tese demonstramos que o mecanismo de invasão de células não-fagocíticas pelo *T. cruzi* depende da sinalização de um amplo conjunto de receptores, cujas especificidades farmacológicas foram caracterizadas nesse trabalho. Nossos estudos foram precedidos por relatos que apontaram o envolvimento de proteases parasitárias no mecanismo de invasão celular.

Os dados que apontam o envolvimento de receptores de endotelina no mecanismo de invasão celular foi o ponto de partida dessa tese. Focalizamos nossa atenção sobre esse sistema de sinalização diante de evidências que os receptores de endotelina são expressos por células endoteliais, células de músculo liso e cardiomiócitos (RUFFOLO, 1995; revisado por KEDZIERSKI e YANAGISAWA 2001). Além disso, sabe-se que a ativação dos receptores de endotelina induz vias de sinalização celular que aumentam  $[Ca^{+2}]_i$  tanto em células endoteliais humanas (MORRIS *et al.*, 1988) quanto em células de músculo liso (KEDZIERSKI e YANAGISAWA, 2001).

O papel de receptores de endotelina na invasão foi investigado através de duas abordagens. Primeiramente, estudamos a interação de TCT Dm28c com células CHO transfectadas com ETbR ou ETaR. Os resultados mostram que as taxas de invasão das células CHO-ETbR ou CHO-ETaR foram seletivamente inibidas pelos antagonistas específicos para esses receptores (Figura 1), indicando que o *T. cruzi* pode infectar células CHO mediante ativação desses GPCRs. É possível que as células CHO apresentem baixos níveis de ET-1 sendo, portanto, capazes de ativar canais de cálcio independentes de voltagem (NSCC-1 e/ou NSCC-2) (ENOKI *et al.*, 1995; KANAWABE *et al.*, 2002).

Em seguida, avaliamos se os TCT ativam essa via em três tipos de células que naturalmente expressam esses receptores, HSMCs, cardiomiócitos e células endoteliais (HUVECs). Esses ensaios revelaram que o antagonista seletivo para o receptores ET<sub>b</sub> (BQ-788) reduziu significativamente a taxa de invasão dos três tipos celulares, enquanto que a adição do antagonista de ET<sub>a</sub>R (BQ-123) inibiu a invasão de HSMCs ou de cardiomiócitos, mas não teve efeito detectável na invasão de HUVECs (Figura 2). Esses resultados são consistentes com a observação de que as células endoteliais expressam exclusivamente ET<sub>b</sub>R (RUFFOLO, 1995). Conforme discutirei adiante, os estudos de interação de TCT Dm28c com HSMCs (uma célula mais susceptível à invasão do que HUVECs) revelaram que ET<sub>b</sub>R e ET<sub>a</sub>R controlam etapas distintas (entrada e retenção) do mecanismo de invasão. Essa interpretação pressupõe que as endotelinas estimulam apenas a via alternativa de invasão de HSMCs, ou seja, o mecanismo que independe da fusão de lisossomos com a membrana plasmática.

Apesar da demonstração que os tripomastigotas invadem diversos tipos celulares *in vitro*, mediante ativação de receptores de endotelina, ainda não sabemos de que modo são gerados os agonistas de ET<sub>a</sub>R e ET<sub>b</sub>R. Conforme descrito na introdução, a ET-1 é secretada constitutivamente por células endoteliais e, em estados inflamatórios, por células de músculo liso vascular (YANAGISAWA *et al.*, 1988; TONNESSEN *et al.*, 1998). A secreção de ET-1 ocorre provavelmente durante o transporte de vesículas através da via secretória (CODER, 2001). A produção de ET-1 (meia-vida de 15-20 minutos) depende do processamento da Big-ET-1 pela ECE-1 ou pode ocorrer independente dela, através da ação de quimases (WYPIJ *et al.*, 1992; NAKANO *et al.*, 1997). As três isoformas de endotelina (ET-1, ET-2, ET-3), geradas a partir do processamento de três genes independentes (INOUE *et al.*, 1989), exercem suas ações biológicas atuando sobre os receptores de subtipo ET<sub>a</sub>R e ET<sub>b</sub>R (ARAI *et al.*, 1990;

SAKURAI *et al.*, 1990). O ETaR tem alta afinidade para ET-1 e ET-2 (agindo na faixa subnanomolar), porém a afinidade para ET-3 é duas ordens de grandeza menor (ARAI *et al.*, 1990). Em contraste, o ETbR tem igual afinidade subnanomolar para as três isoformas de ET (SAKURAI *et al.*, 1990). A geração de ET pode ocorrer tanto na superfície celular (XU *et al.*, 1994) como intracelularmente, durante o transporte de vesículas carregadas de ECE-1 através da via secretória (CODER, 2001). Nesse contexto, devemos considerar o fato que o parasita foi capaz de invadir CHO-ETbR e CHO-ETaR com muita eficiência. Cabe saber se os níveis de produção endógena de big-ET-1 nas células CHO são suficientemente altos para promover a invasão através dos ETRs. Alternativamente, não podemos descartar a priori a possibilidade que o *T. cruzi* seja capaz de produzir peptídeos miméticos de ET-1/ET-3, tirando proveito do alto grau de polimorfismo genético dos membros da superfamília TS (ACOSTA *et al.*, 1994) ou de outras glicoproteínas de superfície. As tentativas de identificar a existência desses peptídeos miméticos através de programas computacionais (Clustal W2; [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) não foram frutíferas até o momento. O alinhamento das sequências das três isoformas da ET com a sequência da TS apresentou baixa identidade (15%).

Nessa tese, apresentamos evidências que o mecanismo de invasão de HUVECs não depende apenas da ativação de receptores de endotelina, ou de receptores de cininas (ainda que nesse último caso o processo seja condicionado pela inibição da ECA). O nosso interesse em investigar a participação de C5aR nesse processo foi motivado por achados recentes (SCHMITZ e colaboradores, em preparação) indicando que os TCT Dm28c processam C5 nativo, gerando o fragmento C5a. Sabe-se que C5a é um potente mediador de inflamação, capaz de estimular contração muscular, liberação de histamina de mastócitos, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A anafilatoxina

C5a promove esses efeitos vasoativos através da ligação a receptores específicos de alta afinidade, C5aR/CD88 (BOULAY *et al.*, 1991; GERARD e GERARD, 1991; SICILIANO *et al.*, 1994). Os receptores de C5a são expressos em células mielóides, incluindo macrófagos (GERARD, *et al.*, 1989; MARTIN *et al.*, 1997) e em células não-mielóides, incluindo células epiteliais bronquiais e alveolares, células endoteliais vasculares e células de músculo liso (HAVILAND *et al.*, 1995).

Empregando o antagonista de C5aR (A8B) como ferramenta, nós constatamos que esse composto inibiu parcialmente a invasão de todos os tipos celulares testados (Figuras 3 e 11B). Considerando que não houve efeito aditivo nas HUVECs quando suplementamos conjuntamente os antagonistas de ETbR e C5aR (Figura 3), infere-se que ETbR e C5aR executam funções inter-relacionadas. Esses resultados também indicam que o parasita não é capaz de compensar o bloqueio de um dos GPCRs, através da ativação do outro GPCR. Essa interdependência pode ser reflexo da formação de heterodímeros entre ETbR e C5aR na membrana plasmática, talvez formando uma unidade funcional única. Alternativamente, é possível que C5aR e ETbR sejam ativados em diferentes momentos do curso temporal da invasão das HUVECs, a exemplo do papel atribuído à ETbR (entrada) e ETaR (retenção), no transcorrer da invasão de HSMCs (Figura 11A).

Considerando que os ensaios de invasão celular com as HUVECs foram sistematicamente realizados na ausência de soro fetal bovino, pergunta-se qual seria a origem do agonista C5a? Usando argumentos semelhantes aos que apresentamos na discussão sobre a origem de ET-1, podemos deduzir que o C5 nativo (precursor de C5a) é provavelmente produzido pelas células alvo. Ainda que seja prematuro afirmar que a cruzipaina seja responsável pela geração de C5a durante a interação do parasita com a célula hospedeira, trabalhos recentes com a cruzipaina purificada indicam que essa

protease é de fato capaz de processar C5a nativo, liberando C5a anafilatoxina (SCHMITZ *et al.*, em preparação). Trabalhos adicionais serão necessários para determinar se os efeitos de inibição da infecção de HUVECs observados na presença do inibidor irreversível de cruzipaina (K11777-VS $\phi$ ) são decorrentes da inibição da produção de C5a pela cruzipaina, à semelhança do mecanismo postulado para a geração de cininas (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000). Devemos mencionar que controles realizados de HUVECs ou HSMCs pré-tratadas com VS $\phi$  (K11777 – inibidor de cruzipaina) mostram que esse composto não interfere com as taxas de invasão do parasita.

Considerando que os receptores ETbR ativam principalmente proteína G<sub>i</sub> e G<sub>q/11</sub> (EGUCHI *et al.*, 1993; CRAMER *et al.*, 2001), resolvemos investigar o papel de influxo de cálcio e AMPc no mecanismo de invasão de HUVECs. O papel do [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> foi avaliado pré-tratando as HUVECs com taspigargina (droga que depleta os estoques de Ca<sup>+2</sup> do retículo endoplasmático e induz o influxo de Ca<sup>+2</sup> extracelular através de SOCC) (THASTRUP *et al.*, 1990). Nossos resultados revelaram que a depleção dos estoques de [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> reduziu em mais de 50% a infecção das HUVECs (Figura 4), sugerindo que o influxo de [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> deve ser importante para a invasão dessa célula. Vale a pena ressaltar que a taxa de invasão residual observada nas HUVECs pré-tratadas com taspigargina foi abolida nas culturas suplementadas com antagonista de ETbR. Esses resultados sugerem a existência de complementaridade entre os efeitos de sinalização controlados por ETbR e aqueles responsáveis pelo disparo de [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>. Em outras palavras, os dados sugerem que essas duas rotas de sinalização são independentes, mas atuam de modo complementar, reforçando a infecção. Estudos mais detalhados serão necessários para determinar se a ativação de ETbR induz influxo de Ca<sup>+2</sup> extracelular mediante ativação de canais de cálcio independentes de voltagem (SOCC). Com base em informações obtidas em outros modelos, sabe-se que diferentes mecanismos de

sinalização de  $\text{Ca}^{+2}$  são acionados por concentrações variáveis de ET-1 em células de músculo liso vascular e fibroblastos (MINOWA *et al.*, 1997; ENOKI *et al.*, 1995). Por exemplo, altas concentrações de ET-1 ( $10^{-8}\text{M}$ ) estimulam tanto a liberação de cálcio intracelular quanto o influxo extracelular de cálcio (MINOWA *et al.*, 1997), enquanto que a ET-1 em baixas concentrações ( $10^{-10}\text{M}$ ), apenas estimula o influxo de cálcio extracelular (ENOKI *et al.*, 1995). Considerando que os antagonistas de ETbR abolem completamente a invasão das HUVECs pré-tratadas com taspigargina, é possível que as concentrações de endotelina (sejam elas geradas na superfície ou em vesículas intracelulares das HUVECs) não atingem níveis suficientemente altos para induzir a liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares. Se essa premissa for correta, as vias responsáveis pela liberação de cálcio a partir de estoques intracelulares (taspigargina-sensíveis) estão sendo mobilizadas pela ativação de outros sinais/receptores.

O papel da PI3K foi também investigado no nosso modelo. O pré-tratamento de HUVECs com wortmamina tornou essas células mais resistentes à invasão, sugerindo que a ativação de PI3K contribui positivamente para o mecanismo de invasão, à semelhança do que foi descrito com outras células (WOLLSEY *et al.*, 2003). Entretanto, a adição do antagonista de ETbR reduziu ainda mais a taxa de invasão das células pré-tratadas com wortmanina (Figura 5). Os efeitos aditivos aqui relatados sugerem que as vias de sinalização controladas por ETbR e aquelas que promovem a ativação de PI3K são independentes, porém, se complementam, aumentando a eficiência da infecção de HUVECs. Dados publicados recentemente demonstram que a  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina kinase II (CAM Kinase II) e a PI3K regulam canais de cálcio independentes de voltagem. A CAM Kinase II regula a atividade de SOCC (ativação dependente de estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$ ) (MACHACA, 2003), mas não abre

NSCC (ativação independente de estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{+2}$ ) (RYAN e KELLY, 1998), enquanto a PI3K promove tanto a ativação de NSCC-2 quanto SOCC em VSMCs, CHO-ETaR e CHO-ETbR (KAWANABE *et al.*, 2002; 2003; 2004), sendo necessária para promover a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ , mas não para a manutenção do influxo de  $\text{Ca}^{+2}$  (KAWANABE *et al.*, 2002; 2003; 2004).

Dados na literatura demonstram que a ativação de receptor ETbR ativa a enzima adenilato ciclase por um mecanismo dependente de c-PLA<sub>2</sub>, induzindo a contração da musculatura lisa de vias aéreas (EL-MOWAFY e BIGGS, 2001). A cPLA2 é a enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico (AA) induzido pela ET-1 (TREVISI *et al.*, 2002). O AA e seus metabólitos biologicamente ativos, leucotrienos, lipoxantinas, prostaglandinas e tromboxanos tem um papel importante na contração vascular e crescimento celular (ANDERSON *et al.*, 1997). Para avaliar se os mecanismos de invasão mediados pelos receptores de endotelina eram dependentes do acúmulo de AMPc, pré-incubamos as HUVECs com MDL12 (inibidor da AC) antes de adicionar os TCT. Os resultados mostraram que houve um aumento na invasão de HUVECs pré-tratadas com MDL-12, indicando que a susceptibilidade da célula aumenta em consequência da queda dos níveis de AMPc. Surpreendentemente, a adição do antagonista de ETbR às essas culturas pré-tratadas com MDL12 acentuou ainda mais essa tendência (Figura 7). Esses resultados sugerem que a redução nos níveis de AMPc converte ETbR em um modulador negativo da invasão. É interessante que o aumento da susceptibilidade das HUVECs pré-tratadas com MDL12 (provocado pelo bloqueio de ETbR), é revertido pela adição do antagonista de C5aR ao meio de cultura (Figura 7). Esses resultados sugerem que alterações nos níveis de AMPc alteram a relação funcional entre C5aR e ETbR: ou seja, concentrações basais de AMPc fazem com que C5aR-ETbR atuem como parceiros, disparando sinais que promovem a invasão. Por



outro lado, situações que provocam a queda de AMPc desfazem essa parceria: enquanto C5aR continua disparando sinais que promovem a invasão do parasita, a sinalização de ETbR atenua essa resposta, tornando as HUVECs menos permissivas à infecção. Ainda não sabemos se o mecanismo de invasão (invaginação pela membrana plasmática versus via de fusão de lisossomos) é afetado por alterações no balanço de AMPc, traduzidas por modificações da relação entre ETbR/C5aR. Trabalhos publicados reportaram que 80% parasitas são internalizados pela via independente de fusão de lisossomas (WOOLSEY e BURLEIGH, 2004). Como a ativação de [ETbR/C5aR] não depende da mobilização de estoques intracelulares de cálcio (Figura 4), acreditamos que os TCT estão sendo internalizados pela via que induz invaginações de membrana plasmática.

Tornando ainda mais complexa essa discussão, dados obtidos com fibroblastos e TCT (cepa Y) demonstram que os níveis de AMPc contribuem para a exocitose lisossomal regulada pela  $[Ca^{+2}]_i$ . (RODRÍGUEZ *et al.*, 1999). Os dados obtidos com HSMCs tratadas com MDL12 revelaram que a inibição da AC reduz a invasão de HSMCs (SANTOS *et al.*, em preparação). Portanto, os resultados obtidos nesses dois modelos são diametralmente opostos ao que descrevemos para HUVECs. Portanto, concluímos que o efeito do AMPc no processo de invasão depende da natureza da célula mamífera testada. Cade determinar se a escolha da cepa de *T. cruzi* também tem impacto sobre as vias AMPc-dependentes de invasão. Nesse contexto, vale mencionar que a cepa Y e Dm28c invadem HSMCs através de mecanismos de sinalização distintos (SANTOS C, tese de doutorado, 2006). No mesmo trabalho, os autores apresentaram fortes indícios que essas diferenças são pelo menos em parte, de variações nos níveis de expressão/secreção da cruzipaina (APARÍCIO *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2005).

Diante de relatos demonstrando que ETbR pode estar acoplado a  $G_i$  em culturas de células endoteliais bovinas (EGUCHI *et al.*, 1993), resolvemos avaliar os efeitos da

toxina PTx (bloqueia a atividade da  $G_i$ ) no mecanismo de invasão de HUVECs. Ao contrário do que registramos com HUVECs pré-tratadas com MDL12, observamos que a PTx protegeu as HUVECs, reduzindo em 60% a invasão dos parasitas. Esses dados sugerem que a via de sinalização controlada por  $G_i$  contribui positivamente no mecanismo de invasão. Considerando o fato que MDL12 teve efeito oposto a PTx (aumentando a taxa de invasão) é provável que os efeitos positivos mediados pela  $G_i$  envolvam ativação de canais seletivos para cátions  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{+2}$  (WICKMAN e CLAPHAM, 1995). Vale a pena lembrar que a adição do antagonista de ETbR às culturas de HUVECs pré-tratadas com PTx diminui ainda mais a taxa de infecção (Figura 6). Esses resultados sugerem que as respostas de sinalização controladas por  $G_i$  e por ETbR tem efeitos aditivos, ou seja, promovem invasão através de mecanismos independentes. Trabalhos publicados demonstram que C5aR se acopla a  $G_i$ , em neutrófilos (ROLLINS, *et al.*, 1991) e astrócitos (SAYAH *et al.*, 1999). Nesta tese, hipotetizamos que C5aR e ETbR foram uma “parceria”, ou seja, agem como um subconjunto funcional. Sendo assim, presume-se que o C5aR também não está acoplado a  $G_i$ , mas essa premissa ainda precisa ser testada.

Vale lembrar que a produção celular de ET-1 é aumentada mediante estimulação das células endoteliais por citocinas, endotoxinas, íons  $Ca^{+2}$ , angiotensina II, TGF- $\beta$  (GORACA, 2002). Esses estímulos podem provocar o acúmulo de ET-1 no plasma, enquanto que a remoção de ET-1 depende de sua interação com ETbR (GREGAN *et al.*, 2004). Considerando que os TCT (Dm28c) induzem extravazamento de plasma através de vênulas pós-capilares mediante ativação de TLR2/B<sub>2</sub>R (TODOROV *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2006), é plausível que o processo inflamatório possa suprir os tecidos infectados com níveis de ET-1 suficientemente altos. Diante dos resultados que obtivemos com cardiomiócitos (Figura 2C), pode-se admitir que o parasita se beneficie

da sinalização mediada por ETRs para infectar células cardiovasculares. Argumentos semelhantes foram levantados para justificar os benefícios mútuos da ativação do sistema cinina em sítios de infecção periférica (revisto por SCHARFSTEIN, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2007; revisado por SCHARFSTEIN *et al.*, 2007).

Dando continuidade aos estudos com HUVECs, realizamos ensaios de invasão na presença de lisinopril (inibidor de ECA) para verificar se a dependência da ativação de ETbR persiste nas condições em que B<sub>2</sub>R é estimulado. De fato, a sinalização mediada por ETbR continua sendo importante na invasão de HUVECs tratadas com lisinopril. Surpreendentemente, a participação de TLR2 e TLR4 no mecanismo de invasão foi detectada quando adicionamos lisinopril ao meio de interação celular. Isso foi constatado quando adicionamos anticorpos neutralizantes anti-TLR2 ou anti-TLR4, na presença ou ausência do inibidor da ECA. A invasão só foi inibida na presença de lisinopril. Cabe ressaltar que a participação de TLR2/TLR4 no mecanismo de invasão de HSMC (i) não dependente da adição de lisinopril (ii) ocorre nos 10 primeiros minutos de interação celular (Figura 11C). Como explicar esses achados? No ensaio com HUVECs, talvez a sinalização de B<sub>2</sub>R tenha impacto na exposição de TLR2, seja promovendo o recrutamento de vesículas (TLR2<sup>+</sup>/TLR4<sup>+</sup>) para a superfície, e/ou alterando sua distribuição nos domínios funcionais de membrana plasmática, quem sabe disponibilizando esses receptores em sítios de sinapse com a membrana do parasita (TYLER *et al.*, 2005). Por outro lado, considerando que HSMCs não sinalizam via B<sub>2</sub>R, é possível que C5aR seja capaz de controlar o tráfego de vesículas carregadas de TLR2/TLR4 de modo análogo ao papel que B<sub>2</sub>R desempenha nas HUVECs tratadas com lisinopril. Complementando esses estudos, investigamos o papel de B<sub>1</sub>R no processo de entrada de HSMCs pré-ativadas com ligante de TLR2 (tGPI-mucina). Nossos resultados revelaram que o antagonista seletivo do receptor B<sub>1</sub> foi capaz de

inibir a entrada dos TCT na célula, indicando sua participação na etapa inicial do processo. Cabe ressaltar que a adição conjunta dos anticorpos anti-TLR2 com antagonista de B<sub>1</sub>R nas culturas de HUVECs pré-ativadas não teve efeitos aditivos na invasão. Da mesma forma, as experiências com HUVECs em repouso mostraram que a adição de HOE-140 não acentou os efeitos de anti-TLR2. Concluindo, esses resultados sugerem que os receptores de cininas e do tipo Toll promovem invasão através de mecanismos interdependentes. Nesse contexto, é oportuno comentar resultados não publicados obtidos em minha tese de mestrado mostrando que células CHO-transfectadas com TLR2 apresentam maior susceptibilidade à invasão, quando comparadas com CHO-controles. Recentemente, verificamos que os efeitos atribuídos à ativação de TLR2 pelos TCT (Dm28c) poderiam ser reflexo da ativação de GPCRs expressos endogenamente: os ensaios feitos na presença de antagonistas de ETbR ou B<sub>2</sub>R não diminuíram a infecção de CHO-TLR2. Os resultados não permitem confirmar (ou excluir) a participação de outros GPCRs no aumento da internalização observado nas CHO-TLR2.

Na segunda etapa dessa tese, analisamos os mecanismos responsáveis pela entrada/retenção do parasita em HSMCs, utilizando condições experimentais recentemente estabelecidas por CHAVES e cols. (tese de doutorado, 2006). Devido aos baixos níveis de infecção observados com as HUVECs, a análise da progressão da infecção foi realizada com HSMCs. Foram realizados ensaios com HSMCs mantidas na condição “basal” versus “pré-ativadas” com ligantes de TLR2, para avaliar a participação de B<sub>1</sub>R nos mecanismos de invasão. Os ensaios de interação foram feitos durante 10 minutos, ou durante 60 minutos, para distinguir as etapas de entrada e retenção. Conforme descrito anteriormente (APARÍCIO *et al.*, 2004), a adição do inibidor da ECA não interfere com o processo de invasão de HSMCs (estado basal).

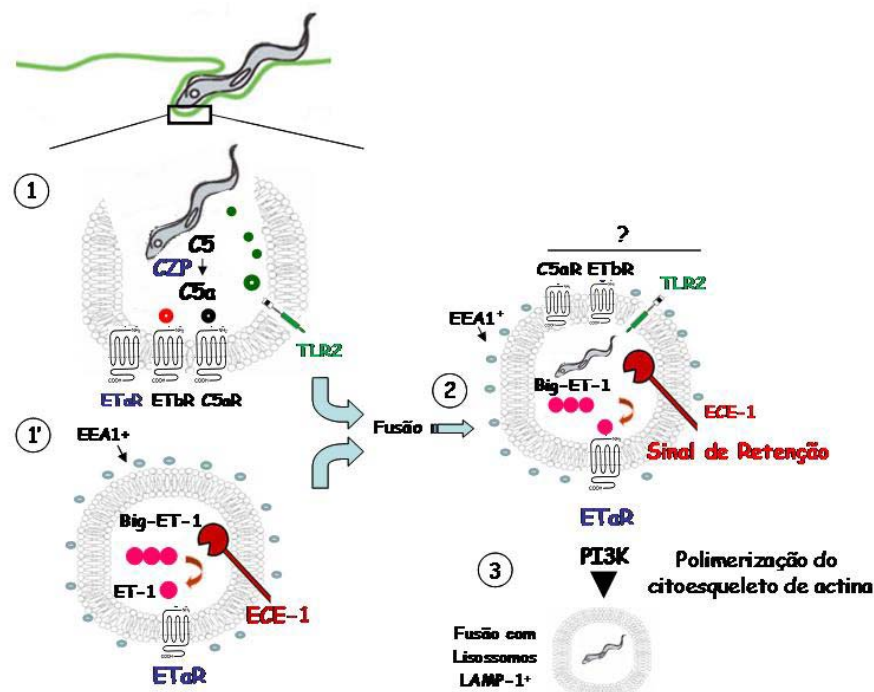
Isso se manifesta pela ausência de efeitos inibitórios de HOE-140 (antagonista de B<sub>2</sub>R) sobre a invasão de HSMCs. Ao adicionar os antagonistas de ETaR e/ou ETbR ao meio de cultura, observamos que ETbR controla exclusivamente a etapa de entrada dos parasitas (ou seja, reduz a invasão nos primeiros 10 minutos da interação celular), enquanto ETaR atua mais tardiamente, gerando o sinal necessário para a retenção intracelular do patógeno (Figura 11A).

Especulamos que o mecanismo diferencial de ação desses dois receptores seja reflexo da diferença no tráfego intracelular desses receptores induzida pela interação com o ligante na dinâmica do processo de invasão celular. Segundo a literatura, os receptores (ETaR e ETbR) são rapidamente desensibilizados por fosforilação via GRK2 após a interação com o ligante ET-1 (FREEDMAN *et al.*, 1997). Enquanto ETaR internalizado via caveola ou clatrina é reciclado, voltando à superfície celular (OKAMOTO *et al.*, 2000), o ETbR (ativado por ET-1 ou ET-3) em células que expressam apenas ETbR, é internalizado exclusivamente via clatrina, sendo em seguida transportado e degradado em endossomos tardios e lisossomos (BREMNES *et al.*, 2000; OKSCHE *et al.*, 2000). Nas células que co-expressam ETaR e ETbR, há formação de heterodímeros (por exemplo, músculo liso, astrócitos) (KITSUKAWA *et al.*, 1994, HARADA *et al.*, 2002; EHRENREICH *et al.*, 1999). A ligação de ET-1 em ETaR e ETbR ocorre simultaneamente, porque o ET-1 possui dois sítios ligantes. Essa interação envolve o ETaR pela porção N-terminal e ao ETbR pela porção C-terminal, resultando na formação do heterodímero (HARADA *et al.*, 2002; SAKAMOTO *et al.*, 1993). A ligação de ET-1 ao heterodímero promove sinais que favorecem a reciclagem dos dois subtipos de receptores para a superfície (BREMNES *et al.*, 2000). Por outro lado, a interação com ET-3 (ligante seletivo de ETbR) resulta na exposição de motivos de transporte que direcionam o ETbR para compartimento endossomal/lisossomal

(BREMNES *et al.*, 2000; OKSCHE *et al.*, 2000). É possível que o estímulo pelo ET-3 associe o heterodímero a uma proteína adaptadora diferente daquela quando o heterodímero é estimulado pela ET-1 (GREGAN *et al.*, 2004). Portanto, os receptores ETaR e ETbR formam heterodímeros constitutivamente, mas essa associação é reversível, sendo mediada pelo agonista seletivo de ETbR e dependente de sua endocitose.

Sujeito a ajustes futuros, podemos sugerir uma hipótese de trabalho para explicar a dinâmica da invasão de HSMCs. ET1 ou ET-3 pode ser liberado na superfície da célula através de mecanismos endógenos, dependentes de ECE. Considerando que existe evidência de formação de heterodímeros de ETaR/ETbR na superfície. É possível que após a interação com o ligante, esse receptor seja internalizado por vesículas endossomais. Devido ao pH ácido, os dímeros se dissociam. Enquanto o ETbR é transportado para lisossomos, onde são em seguida degradados, os receptores ETaR entram na via de reciclagem, fundindo-se à vesículas endossomais que contêm ECE-1 e a Big-ET-1. Essa vesícula, contendo marcadores endossomais, se funde em seguida com o vacúolo parasitóforo nascente, disponibilizando ETaR, ECE e Big-ET1 no ambiente onde o parasita se encontra. Em consequência da geração de ET-1, a PI3K é ativada pela via ETaR, induzindo a remodelagem do citoesqueleto de actina (Esquema 4), cumprindo um pré-requisito importante para a retenção do parasita na célula infectada. Nessa etapa do nosso trabalho, é difícil prever de que modo o C5aR contribui para este processo. Nossos resultados indicam que a ativação de C5aR é importante na etapa de entrada, e não na retenção (Figura 11B). Por conseguinte, é possível que C5aR, ETbR e ETaR façam parte de plataformas de sinalização, inclusive contando com a participação de TLR2 e TLR4 (Figura 9B). Nos últimos anos, surgiram evidências apontando o envolvimento de “rafts” de membrana na transdução de sinais e na invasão de células

por diversos patógenos (INCARDONA e EATON, 2000; MAÑES *et al.*, 2003; LAFONT e VAN DER GOOT, 2005; FERNANDES *et al.*, 2007). Recentemente demonstrou-se que a invasão de células HeLa por tripomastigotas metacíclicos (cepa G e CL) foi inibida após o tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD - droga que depleta colesterol da membrana) (FERNANDES *et al.*, 2007). No entanto, a depleção do colesterol da célula hospedeira resultou apenas na inibição parcial da invasão, sugerindo que os microdomínios de membrana, ricos em colesterol, não são rotas exclusivas de entrada para o *T. cruzi* (FERNANDES *et al.*, 2007). Os nossos dados não permitem determinar se os receptores descritos no nosso modelo de invasão executam suas funções em plataformas de sinalização localizadas em “bolsas” lipídicas. Alternativamente, as parcerias aqui descritas podem ser reflexo de convergência de sinais emitidos por receptores que não estão fisicamente associados (“*cross-talk*”).



**Esquema 4:** Contribuição diferencial dos receptores de endotelina nas etapas de entrada versus retenção do parasita na célula hospedeira

## Papel de B<sub>1</sub>R na patogênese da Doença de Chagas

Gazzinelli e cols. demonstraram que as GPI-mucinas purificadas das formas tripomastigotas (tGPI-mucinas), mas não das formas epimastigotas ou metacíclicas (eGPI-mucina e mGPI-mucinas) são capazes de eliciar uma potente resposta pró-inflamatória (ex.: citocinas e produção de NO) em macrófagos murinos primados com IFN- $\gamma$  e essa atividade pró-inflamatória está restrita à âncora de GPI.

Durante minha tese de mestrado, avaliei se a tGPI-mucina era capaz de induzir a expressão do receptor B<sub>1</sub> nas HUVECs. No referido estudo, mostramos que houve aumento da expressão de B<sub>1</sub>R, sendo que essa indução depende da ativação do fator transcricional NF- $\kappa$ B (ANDRADE *et al.*, em preparação). Como a tGPI-mucina é sabidamente o ligante de TLR2 (CAMPOS *et al.*, 2001), nos perguntamos se a tGPI-mucina era capaz de induzir B<sub>1</sub>R por mecanismos dependentes da ativação de TLR2. Após incubar macrófagos residentes, obtidos de camundongos TLR2<sup>-/-</sup> e C57BL/6 selvagens, com a tGPI-mucina, verificamos que a invasão de macrófagos selvagens envolve a participação de B<sub>1</sub>R, fato que não ocorre nos macrófagos TLR2<sup>-/-</sup>. Estes resultados sugerem que macrófagos ativados pela via tGPI-mucina/TLR2 tornam-se parcialmente susceptíveis à infecção pela via B<sub>1</sub>R-dependente. O impacto desses eventos na progressão da infecção intracelular está sendo atualmente avaliado. (Figura 17).

Em seguida, recorreremos ao modelo de interação com HUVECs para avaliar se os TCT Dm28 vivos, bem como meio condicionado, eram capazes de induzir a expressão de B<sub>1</sub>R. Em experimentos realizados por PCR em tempo real, verificamos que as HUVECs estimuladas com TCT também aumentam a expressão de B<sub>1</sub>R, comparadas com as células em repouso, que, como se sabe, não expressam esse GPCR (Figura 12). A exposição do receptor B<sub>1</sub>R na superfície das HUVECs ativadas foi confirmada em



ensaios de imunofluorescência, seja por TCT, pelo meio condicionado, ou pela tGPI-mucina (Figura 13).

Em seguida, incubamos HUVECs com TCT (Colombiana) para verificar se a indução de B<sub>1</sub>R teria repercussão funcional. A decisão de utilizar essa cepa foi motivada pelo fato que esta apresenta níveis insignificativos de infecção após 2 horas de incubação com as HUVECs. Uma vez confrontadas com TCT (Dm28c), as HUVECs pré-ativadas pelos TCT (Colombiana) tornaram-se susceptíveis à invasão pela via B<sub>1</sub>R-dependente (Figura 16).

Segundo nossa hipótese de trabalho, ambientes inflamados podem criar novas oportunidade para a invasão do *T. cruzi*, mediante sinalização dos receptores B<sub>1</sub>R (TODOROV *et al.*, 2003; revisado por SCHARFSTEIN, 2003). Além dos efeitos tentativamente atribuídos ao aumento de carga parasitária às custas da ativação de B<sub>1</sub>R, essa é uma via patogênica, capaz de promover fibrose (NADAR *et al.*, 1996), recrutamento de leucócitos (McLEAN *et al.*, 2000) e angiogênese (EMANUELLI *et al.*, 2002). Alterações na microcirculação fazem parte das manifestações patológicas da miocardite crônica chagásica (revisado por HIGUCHI *et al.*, 2003). Acredita-se que os danos causados no tecido cardíaco sejam decorrentes das eventuais infecções de células cardíacas pelo parasita (células endoteliais, cardiomiócitos e fibroblastos), processo que pode ser sobreposto por reações auto-imunes ou reações imunopatológicas provocadas por depósitos de antígenos liberados pelo parasita (revisado por HIGUCHI *et al.*, 2003). Todos esses fatores contribuem para uma resposta inflamatória exacerbada, acompanhada de fibrose e danos intensos no tecido cardíaco, caracterizando o quadro patológico da Doença de Chagas (revisado por SCHARFSTEIN, 2003). O interesse no estudo do papel de B<sub>1</sub>R na cardiopatia chagásica é reforçado por estudos de imunohistoquímica feitos com músculo cardíaco proveniente de autópsias de pacientes

chagásicos (cardiopatia severa). Esses estudos revelaram forte marcação de B<sub>1</sub>R no miocárdio (dados não publicados, Martin Metzger, INCOR). Esses estudos nos encorajaram a avaliar a importância da ativação dos receptores B<sub>1</sub>R no desenvolvimento da fibrose cardíaca no modelo murino da Doença de Chagas. Para isso, camundongos selvagens C57BL/6 e B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> foram infectados (s.c) e sacrificados após 4 meses. Os ensaios imunológicos comprovaram que, ao contrário do que ocorre com camundongos B<sub>2</sub>R<sup>-/-</sup> (MONTEIRO *et al.*, 2006), a resposta adaptativa de tipo I foi plenamente preservada. Complementando este estudo, verificamos que os camundongos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> apresentam uma fibrose cardíaca reduzida em comparação com os camundongos selvagens (Figura 22). Estudos adicionais serão necessários para determinar se a atenuação da fibrose no miocárdio observada nos camundongos B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup> é uma consequência indireta da redução do parasitismo cardíaco, e/ou, ser reflexo de uma atenuação da inflamação mediada por B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. Estudos no modelo murino da infecção chagásica demonstraram que as quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  são capazes de induzir o aumento da internalização e destruição do parasita em macrófagos através de mecanismos dependentes de NO (VILLALTA *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 1997). Nessa tese, avaliamos o nível de expressão das quimiocinas RANTES e MIP-1 $\alpha$  por PCR em tempo real nos corações dos camundongos C57BL/6 e B<sub>1</sub>R<sup>-/-</sup>. Nossos resultados mostraram que os animais nocautes infectados apresentaram níveis reduzidos das quimiocinas RANTES e MIP-1 $\alpha$  quando comparados com os corações de animais selvagens infectados (Figura 23). Portanto, é possível que a redução da fibrose observada nos animais B<sub>1</sub>R-deficientes possa ser relacionada com as diferenças observadas nos perfis de quimiocinas pró-inflamatórias.

## **Conclusões:**

Os resultados obtidos na primeira parte da tese demonstram que TCT invadem células endoteliais, músculo liso e cardiomiócitos através de mecanismos dependentes da sinalização de receptores de endotelina, sendo essa invasão dependente da ativação do subconjunto de GPCRs formado por ETbR/C5aR. Os sinais controlados por ETbR/C5aR são independentes do acoplamento a  $G_i$ , da mobilização de  $[Ca^{+2}]_i$  e da ativação de PI3K. No entanto, é necessária a produção de níveis ótimos de AMPc para a formação do subconjunto ETbR/C5aR; baixos níveis de AMPc desacoplam o subconjunto ETbR/C5aR e como consequência, a invasão passa ser controlada pelo C5aR, sendo contra-regulada pela ativação de ETbR. A presença do inibidor da ECA (lisinopril) amplia o número de receptores que controlam a invasão de HUVECs em repouso [C5aR/ETbR/B<sub>2</sub>R/TLR2/TLR4]. Nas HUVECs pré-ativadas (via TLR2), a invasão envolve parceria entre [C5aR/B<sub>1</sub>R/B<sub>2</sub>R/ETbR/TLR2].

A principal lição desses estudos é que a ativação desses subconjuntos tem efeitos dicotômicos sobre a relação parasita-hospedeiro, ou seja, o parasita emprega o mesmo arsenal molecular (proteases que liberam cininas e C5a, ligantes de TLR2 e/ou TLR4) para infectar células não-fagocíticas, ao mesmo tempo em que estimula reações de defesa mediante ativação de células sentinelas do sistema imune (revisado por GAZZINELLI e DENKERS, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2007; revisado por SCHARFSTEIN *et al.*, 2007), favorecendo o equilíbrio da relação parasita-hospedeiro. Estudos adicionais serão necessários para avaliar se a ativação de ETbR e/ou ETaR tem alguma participação em mecanismos de defesa contra a infecção pelo *T. cruzi*.

## 7 - Referências Bibliográficas

- ABDALLA, S., LOTHER, H., QUITTERER, U. (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature*. 407(6800):94-8.
- ACOSTA A, SCHENKMAN RP, SCHENKMAN S. (1994) Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucin-like glycoproteins linked to the parasite membrane by GPI anchors. *Braz J Med Biol Res*. 27(2):439-42.
- AHMAD-NEJAD, P. HÄCKER, H., RUTZ, M., BAUER, S., VABULAS, R.M., WAGNER, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol*. 32: 1958–1968.
- AKIRA, S., TAKEDA, K. (2004) Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews of Immunology*. 4: 499-511.
- ALIBERTI, J., VIOLA, J.P., VIEIRA-DE-ABREU, A., BOZZA, P.T., SHER, A., SCHARFSTEIN, J. (2003) Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol*. 1;170(11):5349-53.
- ALIBERTI, J.C., CARDOSO, M.A., MARTIN, G.A., GAZZINELLI, R.T., VIEIRA, LQ., SILVA, J.S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect. Immun*. 64: 1961-1967.
- ALIBERTI, J.C., MACHADO, F.S., GAZZINELLI, R.T., TEIXEIRA, M.M., SILVA, J.S. (1999a) Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infect Immun*. 67(6):2810-4.
- ALIBERTI, J.C., MACHADO, F.S., SOUTO, J.T., CAMPANELLI, A.P., TEIXEIRA, M.M., GAZZINELLI, R.T., SILVA, J.S. (1999b) beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 67(9):4819-26.
- ALIBERTI, J.C., SOUTO, J.T., MARINO, A.P., LANNES-VIEIRA, J., TEIXEIRA, M.M., FARBER, J., GAZZINELLI, R.T., SILVA, J.S. (2001) Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis

factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 158(4):1433-40.

ALMEIDA I.C., FERGUSON, M.A., SCHENKMAN, S., TRAVASSOS, L.R. (1994). Lytic anti- $\alpha$ -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucine-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 304: 793-802.

ALMEIDA, I.C., CAMARGO, M.M., PROCOPIO, D.O., SILVA, L.S., MEHLERT, A., TRAVASSOS, L.R., GAZZINELLI, R.T., FERGUSON, M.A. (2000) Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *Embo J.* 19: 1476-1485.

ALMEIDA, I.C., GAZZINELLI, R.T. (2001) Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses. *J. Leukoc. Biol.* 70: 467-477.

ALVES, M.J., ABUIN, G., KUWAJIMA, V.Y., COLLI, W. (1986). Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 21: 75–82.

AMES, R.S., LI, Y., SARAU, H.M., NUTHULAGANTI, P., FOLEY, J.J., ELLIS, C., ZENG, Z., SU, K., JUREWICZ, A.J., HERTZBERG, R.P., BERGSMA, D.J., KUMAR, C. (1996) Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *J. Biol. Chem.* 271:20231.

ANDERSON, K.M., ROSHAK, A., WINKLER, J.D., MCCORD, M., MARSHALL, L.A. (1997) Cytosolic 85-kDa phospholipase A<sub>2</sub>-mediated release of arachidonic acid is critical for proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 272(48):30504-11.

ANDRADE, L.O., ANDREWS, N.W. (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* 200: 1135–1143.

ANDRADE, Z.A. (1991) Pathogenesis of Chaga's disease. *Res. Immunol.* 42: 126-129.

ANDREWS, N.W., WHITLOW, M.B. (1989). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol* 33: 249-256.

ANDREWS, NW., ABRAMS, CK., SLATIN, SL., AND GRIFFITHS, G. (1990). A *T. cruzi*- secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61: 1277-1287.

- ANGERS S, SALAHPOUR A, BOUVIER M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:409-35.
- APARICIO, I.M., SCHARFSTEIN, J., LIMA, A.P. (2004) A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect Immun.* 72:5892-5902.
- ARAI H, HORI S, ARAMORI I, OHKUBO H, NAKANISHI S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 348(6303):730-2
- ARAYA, J.E., CANO, M.I., YOSHIDA, N., FRANCO DA SILVEIRA, J. (1994). Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 65: 161–169.
- ARONOFF, D.M., CANETTI, C., SEREZANI, C.H., LUO, M., PETERS-GOLDEN, M. (2005) Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol* 174: 595-599.
- ASLUND L, HENRIKSSON J, CAMPETELLA O, FRASCH AC, PETTERSSON U, CAZZULO JJ. (1991) The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 45(2):345-7.
- ATAYDE, V.D., NEIRA, I., CORTEZ, M., FERREIRA, D., FREYMULLER, E., YOSHIDA, N. (2004). Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. *Int J Parasitol.* 34(7):851-60.
- AUSTIN, C.E., FAUSSENER, A., ROBINSON, H.E., CHAKRAVARTY, S., KYLE, D.J., BATHON, J.M., PROUD, D. (1997) Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272: 11420-11425.
- BACHAR O, ADNER M, UDDMAN R, CARDELL LO. (2004) Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF-kappa B signaling pathways. *Eur J Immunol.* 34(4):1196-207.
- BARKI-HARRINGTON, L., BOOKOUT, A.L., WANG, G., LAMB, M.E., LEEB-LUNDBERG, L.M., DAAKA, Y. (2003) Requirement for direct cross-talk between B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells. *Biochem J.* 371(Pt 2):581-7.
- BASCANDS, J.L., SCHANSTRA, J.P., COUTURE, R., GIROLAMI, J.P. (2003) Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles. *Med Sci (Paris).* 19(11):1093-100.

- BASTOS, I.M., GRELLIER, P., MARTINS, N.F., CADAVID-RESTREPO, G., DE SOUZA-AULT, M.R., AUGUSTYNS, K., TEIXEIRA, A.R., SCHRÉVEL, J., MAIGRET, B., DA SILVEIRA, J.F., SANTANA, J.M. (2005) Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J.* 15; 388(Pt 1):29-38.
- BATTISTINI, B., JENG, A.Y. (2001) Endothelin-converting-enzyme inhibitors and their effects. *In Endothelin and its inhibitors*, 155-208.
- BAYER, A.L., HEIDKAMP, M.C., HOWES, A.L., HELLER BROWN, J., BYRON, K.L., SAMAREL, A.M. (2003) Protein kinase C epsilon-dependent activation of proline-rich tyrosine kinase 2 in neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 35(9):1121-33.
- BAYNASH, A.G., HAMMER, R.E., RICHARDSON, J.A., YANAGISAWA, M. (1997) Severe growth retardation and juvenile lethality in ET-2 knockout mice. *Presented at Int. Conf. Endothelin, 5<sup>th</sup> Kyoto, Japan.*
- BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D., & WORTHY, K. (1992). Bioregulation of kinins: Kallikreins, Kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*44, 1-80.
- BLAIS, C. JR., MARCEAU, F., ROULEAU, J.L., ADAM, A. (2000) The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides.* 21(12):1903-40.
- BLAUKAT, A. (2003) Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia.* 35(1):17-23.
- BLAUKAT, A., BARAC, A., CROSS, M.J., OFFERMANN, S., DIKIC, I. (2000) G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. *Mol Cell Biol* 20(18):6837-48.
- BLAUKAT, A., DIKIC, I. (2001) Activation of sphingosine kinase by the bradykinin B2 receptor and its implication in regulation of the ERK/MAP kinase pathway. *Biol Chem.* 382(1):135-9.
- BONALDO MC, D'ESCOFFIER LN, SALLES JM, GOLDENBERG S. (1991) Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol.*73(1):44-51.
- BORKOWSKI, J.A., RANSOM, R.W., SEABROOK, G.R., TRUMBAUER, M., CHEN, H., HILL, R.G., STRADER, C.D., HESS, J.F. (1995) Targeted disruption of a

B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem.* 9; 270(23):13706-10.

BOULAY, F., MERY, L., TARDIF, M., BROUCHON, L., VIGNAIS, P. (1991) Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* 30: 2993-2999.

BOUVIER, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors.

BOYCE, S., RUPNIAK, N.M., CARLSON, E.J., WEBB, J., BORKOWSKI, J.A., HESS, J.F., STRADER, C.D., HILL, R.G. (1996) Nociception and inflammatory hyperalgesia in B2 bradykinin receptor knockout mice. *Immunopharmacology.* 33(1-3):333-5.

BRAUN, M., DAVIS III, A.E. (1998) Cultured human mesangial cells express the C5a receptor. *J. Immunol.* 54: 1542-1549.

BREMNES T, PAASCHE JD, MEHLUM A, SANDBERG C, BREMNES B, ATTRAMADAL H. (2000) Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem.*275(23):17596-604.

BRIGSTOCK, D.R. (1999) The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr. Rev.* 20: 189-206.

BRIONES, M.R., SOUTO, R.P.,STOLF, B.S., ZINGALES, B. (1999) The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104:219-232.

BROOKS D. P., DEPALMA P. D., PULLEN M., NAMBI P., (1994).*J. Pharmacol. Exp.Ther.*, **268**, 1091—1097

BURCH, R.M., AXELROD, J. (1987) Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(18):6374-8.

BURGOYNE, R.D., CHEEK, T.R. (1987) Reorganisation of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis. *Biosci Rep.* 7(4):281-8.

BURLEIGH BA, WOOLSEY AM. (2002). Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 4(11):701-11.

BURLEIGH, B., ANDREWS, N.W. (1995a). A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca<sup>2+</sup> signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 5172–5180.



- BURLEIGH, B.A., ANDREWS, N.W. (1995b) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*, 49:175-200.
- BUSCAGLIA CA, CAMPO VA, FRASCH AC, DI NOIA JM. (2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*. 4(3):229-36.
- BUSK, P.K., BARTKOVA, J., STRØM, C.C., WULF-ANDERSEN, L., HINRICHSEN, R., CHRISTOFFERSEN, T.E., LATELLA, L., BARTEK, J., HAUNSØ, S., SHEIKH, S.P. (2002) Involvement of cyclin D activity in left ventricle hypertrophy *in vivo* and *in vitro*. *Cardiovasc Res*. 56(1):64-75.
- CALER, E.V., VAENA, S., HAYNES, P.A., ANDREWS, N.W., BURLEIGH, B.A. (1998). Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* invasion. *EMBO J* 17: 4975–4986.
- CALER, E.V., MORTY, R.E., BURLEIGH, B.A., AND ANDREWS, N.W. (2000). Dual role of signaling pathways leading to Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 68: 6602–6610.
- CALER, E.V., CHAKRABARTI, S., FOWLER, K.T., RAO, S., ANDREWS, N.W. (2001). The Exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*. 193(9):1097-104.
- CAMARGO, M.M., ALMEIDA, I.C., PEREIRA, M.E., FERGUSON, M.A.J., TRAVASSOS, L.R., GAZZINELLI, R.T. (1997a) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol* 158: 5890-5901.
- CAMARGO, M.M., ANDRADE, A.C., ALMEIDA, I.C., TRAVASSOS, L.R., GAZZINELLI, R.T. (1997b) Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J. Immunol*. 159: 6131-6139.
- CAMARGOS, E.R.S., ROCHA, L.L.V., RACHID, M.A., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, A.J., TEIXEIRA, JR. A.L., CHIARI, E., BARTON, M., TEIXEIRA, M.M., MACHADO, C.R.S. (2004) Protective role of ETa endothelin receptors during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Inf*. 6: 650-656.
- CAMPETELLA, O., HENRIKSSON, J., ASLUND, L., FRASCH, A.C., PETTERSSON, U., CAZZULO, J.J. (1992) The major cysteine proteinase (cruzipain)

from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol Biochem. Parasitol.* 50:225-234.

CAMPOS, M., ALMEIDA, I., TAKEUCHI, O., AKIRA S., VALENTE, E., PROCÓPIO, D., TRAVASSOS, L., SMITH, J., GOLENBOCK, D., GAZZINELLI, R. (2001) Activation of Toll-like receptors by glycosphosphatidylinositol-anchors from protozoan parasite. *J. Immunol.* 167: 416-423.

CAMPOS, M.A., CLOSEL, M., VALENTE, E.P., CARDOSO, J.E., AKIRA, S., ALVAREZ-LEITE, J.I., ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. (2004) Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 172: 1711-1718.

CAMPTELLA M.C., SANCHEZ, D., CAZZULLO, J.J., FRASH A.C. (1992) A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens. *Parasitology Today.* 8(11): 378-381.

CARVALHO, T.M., DE SOUZA, W., COIMBRA, E.S. (1999) Internalization of components of the host cell plasma membrane during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:143-7.

CASSIM, B., MODY, G., BHOOLA, K. (2002) Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacol Ther.* 94(1-2):1-34.

CAVAILLON, J.M., FITTING, C., HAEFNER-CAVAILLON, N. (1990) Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *Eur. J. Immunol.* 20: 253-257.

CAZZULO J.J., CAZZULO FRANKE MC, MARTÍNEZ J, FRANKE DE CAZZULO BM. (1990) Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* 1037(2):186-91.

CAZZULO, J.J., STOKA, V., TURK, V. (1997) Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol Chem.* 378(1):1-10.

CHAGAS, C (1909). Nova tripanosomíase humana *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:11-84.

CHANDRA M, TANOWITZ HB, PETKOVA SB, HUANG H, WEISS LM, WITTNER M, FACTOR SM, SHTUTIN V, JELICKS LA, CHAN J, SHIRANI J. (2002) Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int J Parasitol.* Jun 15;32(7):897-905.

CHANDRASEKA B., MELBY, P.C., TROYER, D.A., COLOCSTON, J.T., FREEMAN, G.L. (1998) Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and

inducible nitric oxide synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* 152: 925-934.

CHAVES, L.B., BRIONES, M.R., SCHENKMAN, S. (1993) Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 61(1):97-106.

CHEN, K., HUANG, J., GONG, W., IRIBARREN, P., DUNLOP, N.M., WANG, J.M. (2007) Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int. Immunopharmacol.* 7: 1271–1285.

CHENG, T.H., CHENG, P.Y., SHIH, N.L., CHEN, I.B., WANG, D.L., CHEN, J.J. (2003) Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 1845e1854.

CHENOWETH, D.E., HUGLI, T.E. (1978) Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3943-3947.

CHUANG, T., ULEVITCH, R.J. (2001) Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1518 157-161.

CODER, R. (2001) Identity of endothelin-converting-enzyme and other targets for the therapeutic regulation of endothelin biosynthesis. *In Endothelin and its inhibitors*, 35-67.

COELHO, P.S., KLEIN, A., TALVANI, A., COUTINHO, S.F., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., SILVA, J.S., CANIZZARRO, H., GAZZINELLI, R.T., TEIXEIRA, M.M. (2002) Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- $\gamma$ -primed-macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 71: 837-844.

COIMBRA, V.C., YAMAMOTO, D., KHUSAL, K.G., ATAYDE, V.D., FERNANDES, M.C., MORTARA, R.A., YOSHIDA, N., ALVES, M.J., RABINOVITCH, M. (2007) Eucleated L929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. *Infect Immun.* 2007 75(8):3700-6.

COPPENS, I., JOINER, K.A. (2003) Host but not parasite cholesterol controls Toxoplasma cell entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell.* 14(9):3804-20.

CORTEZ, M., ATAYDE, V., YOSHIDA, N. (2006). Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive Escherichia coli. *Microbes Infect.* 8(6):1502-12.

- CORVERA, S., CZECH, M.P. (1998) Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol.* 8(11):442-6.
- COSSART, P., SANSONETTI P.J. (2004). Bacterial invasion: the paradigm of enteroinvasive pathogens. *Science* 304: 242–248.
- COUTURE R., LINDSEY, C.J. (2000). Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. *Handbooks of Chemical Neuroanatomy. Peptide Receptors*, part I, vol.16, pp.241-300.
- COUTURE, R., HARRISSON, M., VIANNA, R.M., CLOUTIER, F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 19;429(1-3):161-76.
- CRAMER, H., SCHMENGER, K., HEINRICH, K., HORSTMAYER, A., BÖNING, H., BREIT, A., PIIPER, A., LUNDSTROM, K., MÜLLER-ESTERL, W., SCHROEDER, C. (2001) Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *Eur J Biochem.* 268(20):5449-59.
- CROSS, G.A., TAKLE, G.B. (1993) The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.*;47:385-411.
- DAVENPORT A. P., KUC R. E., MAQUIR J. J., HARLAND S. P., (1995) *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, **26** (Suppl. 3), S265—S267.
- DE NUCCI, G., GRYGLEWSKI, R.J., WARNER, T.D., VANE, J.R. (1988) Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(7):2334-8.
- DE WEERD, W.F., LEEB-LUNDBERG, L.M. (1997) Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 11;272(28):17858-66.
- DÉCARIE, A., RAYMOND, P., GERVAIS, N., COUTURE, R., ADAM, A. (1996) Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am. J. Physiol.* 270: H1340 H1347.
- DEDDISH, P.A., MARCIC, B., JACKMAN, H.L., WANG, H.Z., SKIDGEL, R.A., ERDÖS, E.G. (1998) N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension.* 31(4):912-7.
- DEL NERY, E., JULIANO, M.A., LIMA, A.P.C.A., SCHARFSTEIN, J., JULIANO, J. (1997). Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 272:25713-25718.

- DENKERS, E.Y., GAZZINELLI, R.T, (2007) Protozoans in Macrophages. *Landes in biosciences. Medical Intelligence unit*
- DEVERA, R., FERNANDES, O., COURA, JR. (2003). Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98(1):1-12.
- DEVI, LA. (2001) Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*. 22(10):532-7.
- DIAS WB, FAJARDO FD, GRAÇA-SOUZA AV, FREIRE-DE-LIMA L, VIEIRA F, GIRARD MF, BOUTEILLE B, PREVIATO JO, MENDONÇA-PREVIATO L, TODESCHINI AR. (2008) Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*. 10(1):88-99.
- DIAS, J.C. (1989) The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 22(3):147-56.
- DIEBOLD, S.S., KAISHO, T., HEMMI, H., AKIRA, S., REIS E SOUZA, C. (2004) Innate antiviral response by means of TLR7 mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 303: 1529-1531.
- DING, Q., GROS, R., GRAY, I.D., TAUSSIG, R., FERGUSON, S.S., FELDMAN, R.D. (2004) Raf kinase activation of adenylyl cyclases: isoform-selective regulation. *Mol Pharmacol* 66: 921-928.
- Do CARMO MS, DOS SANTOS MR, CANO MI, ARAYA JE, YOSHIDA N, DA SILVEIRA JF. (2002) Expression and genome-wide distribution of the gene family encoding a 90 kDa surface glycoprotein of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*.125(1-2):201-6.
- DONCKIER, J.E., HANET, C., BERBINSCHI, A., GALANTI, L., ROBERT, A., VAN MECHELEN, H., POULEUR, H., KETELSLEGERS, J.M. (1991) Cardiovascular and endocrine effects of endothelin-1 at pathophysiological and pharmacological plasma concentrations in conscious dogs. *Circulation*. 84(6):2476-84.
- DORTA, M.L., FERREIRA, A.T., OSHIRO, M.E., YOSHIDA, N. (1995) Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 73(1-2):285-9.
- DOWNEY, G.P., CHAN, C.K., TRUDEL, S., GRINSTEIN, S. (1990) Actin assembly in eletropermeabilized neutrophils: role of intracellular calcium. *J. Cell. Biol*. 110: 1975-82

- DRAY A. (1997) Kinins and their receptors in hyperalgesia *J Can J Physiol Pharmacol.* 75(6):704-12.
- DRAY, A., PERKINS, M. (1993). Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 16, 99-104.
- DROUIN, S.M., KILDGAARD, J., HAVILAND, J., ZABNER, J., JIA, H.P., MCCRAY, P.B. JR., TACK, B.F., WETSEL, R.A. (2001) Expression of the complement anaphylatoxin C3a and C5a receptors on bronchial epithelial and smooth muscle cells in models of sepsis and asthma. *J Immunol.* 166(3):2025-32.
- DU X, A. POLTORAK, Y. WEI, B. BEUTLER, (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur.Cytokine Netw.* 11: 362- 371.
- ECHTENACHER, B., MANNEL, D.N., HULTNER, L. (1996) Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature.* 381:75-77.
- EGUCHI, S., HIRATA, Y., MARUMO, F. (1993) Endothelin subtype B receptors are coupled to adenylate cyclase via inhibitory G protein in cultured bovine endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* S161-3.
- EHRENREICH H. (1999) The astrocytic endothelin system: toward solving a mystery focus on "distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling. *Am J Physiol.* 277(4 Pt 1):C614-5
- EL-MOWAFY, A.M., BIGGS, D.F. (2001) ETB receptor activates adenylyl cyclase via a c-PLA(2)-dependent mechanism: a novel counterregulatory mechanism of ET-induced contraction in airway smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 286(2):388-93.
- EMANUELI, C., SALIS, MB., STACCA, T., PINTUS, G., KIRCHMAIR, R., ISNER, JM., PINNA, A., GASPA, L., REGOLI, D., CAYLA, C., PESQUERO, JB., BADER, M., MADEDDU, P. (2002) Targeting kinin B1 receptor for therapeutic neovascularization . *Circulation;* 105: 360-366.
- EMBER JA, SANDERSON SD, HUGLI TE, MORGAN EL. (1994) Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. *Am J Pathol.*144(2):393-403.
- EMBER, J.A., SANDERSON, S.D., HUGLI, T.E., MORGAN, E.L. (1994) Induction of interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. *Am. J. Pathol.* 144: 393-40.

- EMOTO, N., YANAGISAWA, M. (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem.* 270(25):15262-8.
- ENDO, M., FUJITA, S., YANG, H.T., TALUKDER, M.A., MARUYA, J., NOROTA, I. (1998) Endothelin: receptor subtypes, signal transduction, regulation of Ca<sup>2+</sup> transients and contractility in rabbit ventricular myocardium. *Life Sci.* 62 (17-18):1485-9.
- ENGEL, J.C., DOYLE, P.S., HSIEH, I., MCKERROW, J.H. (1998). Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 188:725-734.
- ENOKI, T., MIWA, S., SAKAMOTO, A., MINOWA, T., KOMURO, T., KOBAYASHI, S., NINOMIYA, H., MASAKI, T. (1995) Long-lasting activation of cation current by low concentration of endothelin-1 in mouse fibroblasts and smooth muscle cells of rabbit aorta. *Br J Pharmacol.* 115(3):479-85.
- FACTOR, S.M., CHO, S., WITTNER, M., TANOWITZ, H. (1985) Abnormalities of the coronary circulation in acute murine Chagas disease. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 34: 246-53.
- FAN, J., FREY, R.S., MALIK, A.B. (2003) TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 112: 1234-1243.
- FAN, J., MALIK, A.B. (2003) Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling augments chemokine-induced neutrophil migration by modulating cell surface expression of chemokine receptors. *Nat Med.* 9(3): 315-21.
- FARKAS, I., BARANYI, L., TAKAHASHI, M., FUKUDA, A., LIPOSITS, Z., YAMAMOTO, T., ODADA, H. (1998) A neuronal C5a receptor and an associated apoptotic signal transduction pathway. *J. Physiol.* 507: 679-687.
- FAURE, E., THOMAS, L., XU, H., MEDVEDEV, A., EQUILS, O., ARDITI, M. (2001) Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol.* 1: 166 (3); 2018-24.
- FAUSSNER, A., BATHON, J.M., PROUD, D. (1999) Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology.* 45(1-3):13-20.

FENG, W., WANG, Y., ZHANG, J., WANG, X., LI, C., CHANG, Z. (2000) Effects of CTx and 8-bromo-cAMP on LPS-induced gene expression of cytokines in murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 570-573.

FERNANDES, M.C., CORTEZ, M., GERALDO YONEYAMA, K.A., STRAUS, A.H., YOSHIDA, N., MORTARA, R.A. (2007) Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains.. *Int J Parasitol.* 37(13):1431-41.

FERNANDES, O., MANGIA, R.H, LISBOA, C.V, PINHO, A.P., MOREL, C.M., ZINGALES, B., CAMPBELL, D.A., JANSEN, A.M. (1999). The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118: 161-166.

FERNANDEZ-GOMEZ ESTEBAN, S., GOMEZ-CORVERA, R., ZOULIKA, K., OUAISSI, A. (1998) *Trypanosoma cruzi*: Tc52 release protein-induced increase expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages. *J. Immunol.* 160: 3471-3474.

FERREIRA D, CORTEZ M, ATAYDE VD, YOSHIDA N. (2006) Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infect Immun.* 74(10):5522-8.

FLAMANT, M., THARAUX, P.L., PLACIER, S., HENRION, D., COFFMAN, T., CHATZIANTONIOU, C., DUSSAULE, J.C. (2003) Epidermal growth factor receptor trans-activation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J.* 17(2):327-9.

FLO, T.H., HALAAS, O., TORP, S., RYAN, L., LIEN, E., DYBDAHL, B., SUNDAN, A., ESPEVIK, T. (2001) Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol.* 69 (3); 474-81.

FREITAS, J.M., AUGUSTO-PINTO, L., PIMENTA, J.R., BASTOS-RODRIGUES, L., GONÇALVES, V.F., TEIXEIRA, S.M., CHIARI, E., JUNQUEIRA, A.C., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., PENA, S.D. (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2(3):e24. Epub 2006 Mar 31.

FREITAS, J.M., LAGES-SILVA, E., CREMA, E., PENA, S.D., MACEDO, A.M. (2005) Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol.* 35(4):411-7



- FREVERT, U., SCHENKMAN, S., NUSSENZWEIG, V. (1992) Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 60(6):2349-60.
- FUREDOR, W., AGIS, H., WILLHEIM, M., BANKL, H.C., MAIER, U., KISHI, K., MULLER, M.R., CZERWENKA, K., RADASZKIEWICZ, T., BUTTERFIELD, J.H. (1995). Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells: evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J. Immunol.* 155:3152.
- GALLO JÚNIOR, L., MORELO FILHO, J., MACIEL, B.C., MARIN NETO, J.A., MARTINS, L.E., LIMA FILHO, E.C. (1987) Functional evaluation of sympathetic and parasympathetic system in Chagas' disease using dynamic exercise. *Cardiovasc Res.* 21: 922-7.
- GAO, W., PEREIRA, M.A. (2001) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* 31: 1503-1512.
- GASQUE, P. (2004) Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol.* 41(11):1089-98.
- GASQUE, P., CHAN, P., FONTAINE, M., ISCHENKO, A., LAMACZ, M., GOÈ TZE, O., MORGAN, B.P. (1995) Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes. *J. Immunol.* 155: 4882-4889.
- GAZZINELLI, R.T., DENKERS, E.Y. (2006) Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* 6(12):895-906.
- GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P., HIENY, S., JAMES, S., SHER, A. (1992) Microbicidal activity of IFN- $\gamma$  treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor. *Eur. J. immunol.* 22: 2501-2506.
- GAZZINELLI, R.T., RODRIGUES, M.M., ALMEIDA, I.C., TRAVASSOS, L.R. (2000) Role of parasite surface glycoconjugates on induction/regulation of immune responses and inflammation, elicited during *Trypanosoma cruzi* infection: potential implications on pathophysiology of Chagas' disease. *Cult. J. Braz. Assoc. Adv. Sci,* 51, 411-428.
- GERARD, N.P., GERARD, C. (1991) The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349: 614-617.

- GERARD, N.P., GERARD, C. (1991). The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349:614.
- GERARD, N.P., HODGES, M.K., DRAZEN, J.M., WELLER, P.F., e GERARD, C. (1989) Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 264:1760.
- GILLMOR SA, CRAIK CS, FLETTERICK RJ. (1997) Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Sci.* 6(8):1603-11
- GIORDANO, R., CHAMMAS, R., VEIGA, S.S., COLLI, W., ALVES, M.J.M. (1994). An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol* 65: 85–94.
- GOLDSTEIN RH, WALL M. (1984) Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin. *J Biol Chem.* 259(14):9263-8.
- GORACA, A. (2002) New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul.* 36(4):161-7.
- GOTO, K. (2001) Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 1219-1230.
- GOTO, K., KASUYA, Y., MATSUKI, N., TAKUWA, Y., KURIHARA, H., ISHIKAWA, T., KIMURA, S., YANAGISAWA, M., MASAKI, T. (1989) Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(10):3915-8.
- GRANTCHAROVA, E., REUSCH, H.P., BEYERMANN, M., ROSENTHAL, W., OKSCHE, A. (2006) Endothelin A and endothelin B receptors differ in their ability to stimulate ERK1/2 activation. *Exp Biol Med (Maywood).* 231(6):757-60.
- GREGAN, B., JÜRGENSEN, J., PAPSDORF, G., FURKERT, J., SCHAEFER, M., BEYERMANN, M., ROSENTHAL, W., OKSCHE, A. (2004) Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem.* 279(26):27679-87.
- GRELLIER, P., VENDEVILLE, S., JOYEAU, R., BASTOS, I.M., DROBECQ, H., FRAPPIER, F., TEIXEIRA, A.R., SCHRÉVEL, J., DAVIOUD-CHARVET, E., SERGHERAERT, C., SANTANA, J.M. (2001) *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem.* 14;276(50):47078-86.

- GUARDA, E., MYERS, P.R., BRILLA, C.G., TYUGI, S.C., WEBER, K. T. (1993) Effects of endothelin on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* 27:213-2134.
- GUIBERT, C., BEECH, D.J. (1999) Positive and negative coupling of the endothelin ETA receptor to Ca<sup>2+</sup>-permeable channels in rabbit cerebral cortex arterioles. *J Physiol.* 1;514 ( Pt 3):843-56.
- HAASEMANN, M., CARTAUD, J., MULLER-ESTERL, W., DUNIA, I. (1998) Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J Cell Sci.* 111: 917-28.
- HALL, B.S., PEREIRA, M.A. (2000). Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian cells. *Infect Immun* 68: 2077–2081.
- HALL, J.M., MORTON, I.K. (1997) Immunopharmacology of bradykinin receptors. In the kinin system. Edited by farmer S.D. *Handbook of Immunopharmacology*. The Academy Press, London.
- HARADA N, HIMENO A, SHIGEMATSU K, SUMIKAWA K, NIWA M. (2002) Endothelin-1 binding to endothelin receptors in the rat anterior pituitary gland: possible formation of an ETA-ETB receptor heterodimer. *Cell Mol Neurobiol.* 22(2):207-26.
- HARTH, G., ANDREWS, N., MILLS, A.A., ENGEL, J.C., SMITH, R., MCKERROW, J.H. (1993). Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 58(1):17-24.
- HAVILAND, D.L., MCCOY, R.L., WHITEHEAD, W.T., AKAMA, H., MOLMENTI, E.P., BROWN, A., HAVILAND, J.C., PARKS, W.C., PERLMUTTER, D.H., WESTEL, R.A. (1995) Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): Demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J. Immunol.* 154: 1861-1868.
- HAVILAND, D.L., MCCOY, R.L., WHITEHEAD, W.T., AKAMA, H., MOLMENTI, E.P., BROWN, A., HAVILAND, J.C., PARKS, W.C., PERLMUTTER, D.H., e WETSEL, R.A. (1995) Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J. Immunol.* 154:1861.
- HEIL, F., AHMAD-NEJAD, P., HEMMI, H., HOCHREIN, H., AMPENBERGER, F., GELLERT, T., DIETRICH, H., LIPFORD, G., TAKEDA, K., AKIRA, S., WAGNER, H., BAUER, S. (2003) The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine

uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 e 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 33: 2987-2997.

HEIL, F., HEMMI, H., HOCHREIN, H., AMPENBERGER, F., KIRSCHINING, C., AKIRA, S., LIPFORD, G., WAGNER, H., BAUER, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 303: 1526-1529.

HEMMI, H., TAKEUCHI, O KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K., AKIRA, S. (2000) Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 408: 740-745.

HENRIQUEZ, D., PIRAS, R., PIRAS, M.M. (1981) The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 2(5-6):359-66.

HESS, J.F., BORKOWSKI, J.A., MACNEIL, T., STONESIFER, G.Y., FRABER, J. STRADER, C.D., RANSOM, R.W., (1994). Differential pharmacology of cloned human and mouse B<sub>2</sub> bradykinin receptors. *Mol. Pharmacol.* 45, 1-8.

HIGUCHI, M.L., BENVENUTI, L.A., MARTINS REIS, M., METZGER, M. (2003) Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res.* 60(1): 96-107.

HIGUCHI, M.L., BRITO, T., REIS, M.M., BARBOSA, A., BELLOTTI, G., PEREIRA-BARRETO, A.C., PILEGGI, F. (1993). Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis; light microscopy and immuno-histochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.* 2:101.

HIGUCHI, M.L., FUKASAWA, S., DE BRITO, T., PARZIANELLO, L.C., BELLOTTI, G., RAMIRES, J.A. (1999). Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart* 82: 279-285.

HOOPER, N.M., TURNER, A.J. (1988) Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Aminopeptidase P is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol moiety. *FEBS Lett;* 229:340-4.

HORNG, T., BARTON, G.M., FLAVELL, R.A., MEDZHITOV, R. (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signaling specificity for toll-like receptors. *Nature.* 420(6913):329-333.

- HOSHINO, K., KAISHO, T., IWABE, T., TAKEUCHI, O., AKIRA, S. (2002) Differential involvement of IFN- in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol.* 14:1225-31.
- HUANG, H., CHAN, J., WITTNER, M., JELICKS, L.A., MORRIS, S.A., FACTOR, S.M., WEISS, L.M., BRAUNSTEIN, V.L., BACCHI, C.J., YARLETT, N., CHANDRA, M., SHIRANI, J., TANOWITZ, H.B. (1999) Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31:75-88.
- HUANG, H., PETKOVA, S.B., COHEN, A.W., BOUZAHZAH, B., CHAN, J., ZHOU, J.N., FACTOR, S.M., WEISS, L.M., KRISHNAMACHARY, M., MUKHERJEE, S., WITTNER, M., KITSIS, R.N., PESTELL, R.G., LISANTI, M.P., ALBANESE, C., TANOWITZ, H.B. (2003) Activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in murine Chagasic myocarditis. *Infect Immun.* 71(5):2859-67.
- IMLER, J.L., HOFFMANN, J.A. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol.* 11,( 7); 304-11.
- INCARDONA, J.P., EATON, S. (2000) Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 12(2):193-203.
- INOUE, A., YANAGISAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K., MASAKI, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(8):2863-7.
- ISHIHATA, A., TASAKI, K., KATANO, Y. (2002) Involvement of p44/42 mitogen-activated protein kinases in regulating angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol.* 445(3):247-56.
- IWAMURO, Y., MIWA, S., MINOWA, T., ENOKI, T., ZHANG, X.F., ISHIKAWA, M., HASHIMOTO, N., MASAKI, T. (1998) Activation of two types of Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel by endothelin-1 in A7r5 cells. *Br J Pharmacol.* 124(7):1541-9.
- IWASAKI, H., EGUCHI, S., UENO, H., MARUMO, F., HIRATA, Y. (1999) Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology.* 140(10):4659-68.

- JASPARD, E., WEI, L., ALHENC-GELAS, F. (1993) Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 5;268(13):9496-503.
- JELICKS, L.A., CHANDRA, M., SHIRANI, J., SHTUTIN, V., TANG, B., CHRIST, G.J., FACTOR, S.M., WITTNER, M., HUANG, H., WEISS, L.M., MUKHERJEE, S., BOUZAHZAH, B., PETKOVA, S.B., TEIXEIRA, M.M., DOUGLAS, S.A., LOREDO, M.L., D'ORLEANS-JUSTE, P., TANOWITZ, H.B. (2002) Cardioprotective effects of phosphoramidon on myocardial structure and function in murine Chagas' disease. *Int J Parasitol.* 32(12):1497-506.
- JONES, E.M., COLLEY, D.G., TOSTES, S., LOPES, E.R., VNENCAK-JONES, C.L., MCCURLEY, T.L. (1993) Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 48(3):348-57.
- JORDAN, B.A., TRAPAIIDZE, N., GOMES, I., NIVARTHI, R., DEVI, L.A. (2001) Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(1):343-8.
- KAWAI, T., AKIRA, S. (2007) TLR signaling. *Semin Immunol.* 19(1):24-32.
- KAWANABE, Y., HASHIMOTO, N., MASAKI, T. (2002) Effects of phosphoinositide 3-kinase on the endothelin-1-induced activation of voltage-independent  $Ca^{2+}$  channels and mitogenesis in Chinese hamster ovary cells stably expressing endothelin(a) receptor. *Mol Pharmacol.* 62(3):756-61.
- KAWANABE, Y., HASHIMOTO, N., MASAKI, T. (2003) Role of phosphoinositide 3-kinase in the nonselective cation channel activation by endothelin-1/endothelinB receptor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284(2):C506-10.
- KAWANABE, Y., HASHIMOTO, N., MASAKI, T. (2004) Effects of phosphoinositide 3-kinase on endothelin-1-induced activation of voltage-independent  $Ca^{2+}$  channels and vasoconstriction. *Biochem Pharmacol.* 68(2):215-21.
- KAWANABE, Y., NAULI, S.M. (2005) Involvement of extracellular  $Ca^{2+}$  influx through voltage-independent  $Ca^{2+}$  channels in endothelin-1 function. *Cell Signal.* 17(8):911-6.
- KAWASHITA, S.Y., SANSON, G.F., FERNADES, O., ZINGALES, B., BRIONES, M.R. (2001) Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene

- sequences suggests two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraespecific evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18: 2250-2259.
- KEDZIERSKI, R. M., YANAGISAWA, M. (2001) Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:851-876.
- KIREEVA, M.L., LATINKIC, B.V., KOLESNIKOVA, T.V., CHEN, C.C., YANG, G.P., ABLER, A.S., LAU, L.F. (1997) Cyr 61 and Fisp 12 are both ECM-associated signaling molecules: Activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res.* 233: 63-77.
- KISANUKI, Y., OHUCHI, Y., TAKAHASHI, H., HAMMER, R.E., WILLIAMS, S.C. (1999). Endothelial cell-specific knock-out of the endothelin-1 gene in mice. *Presented at Int. Conf. Endothelins, 6<sup>th</sup>, Montreal, Canada.*
- KITSUKAWA Y, GU ZF, HILDEBRAND P, JENSEN RT. (1994) Gastric smooth muscle cells possess two classes of endothelin receptors but only one alters contraction. *Am J Physiol.* 266(4 Pt 1):G713-21.
- KOBAYASHI, K., HERNADEZ, L.D., GALAN, J.E., JANEWAY, C.A. JR., MEDZHITOV, R., FLAVELL, R.A. (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 110 (2): 191-202.
- KOBERLE F. (1974) Pathogenesis of Chagas' disease. In: CIBA Foundation Symposium 20. Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. *Amsterdam: Associated Scientific Publishers:137-58.*
- KÖBERLE, F. (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv Parasitol.*6:63-116.
- KODAMA, H., FUKUDA, K., TAKAHASHI, T., SANO, M., KATO, T., TAHARA, S., HAKUNO, D., SATO, T., MANABE, T., KONISHI, F., OGAWA, S. (2002) Role of EGF Receptor and Pyk2 in endothelin-1-induced ERK activation in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 34(2):139-50.
- KOHLSTEDT, K., BRANDES, R.P., MÜLLER-ESTERL, W., BUSSE, R., FLEMING, I. (2004) Angiotensin-Converting Enzyme Is Involved in Outside-In Signaling in Endothelial Cells. *Circ Res.* 94:60-67.
- KRETZSCHMAR, T., JEROMIN, A., GIETZ, C., BAUTSCH, W., KLOS, A., KOHL, J., RECHKEMMER, G., BITTER-SUERMAN, D. (1993) Chronic myelogenous leukemia-derived basophilic granulocytes express a functional active receptor for the anaphylatoxin C3a. *Eur. J. Immunol.* 23:558.
- KURIMOTO, Y., DE WECK, A.L., DAHINDEN, C.A. (1989) Interleukin 3-dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J. Exp.Med.* 170, 467-479.

- LACY, M., JONES, J., WHITTEMORE, S.R., HAVILAND, D.L., WETSEL, R.A., BARNUM, S.R. (1995) Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J. Neuroimmunol.* 61: 71-78.
- LAFONT, F., VAN DER GOOT, F.G. (2005) Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol.* 7(5):613-20.
- LARRIVÉE J.F., BACHVAROV, DR., HOULE, F., LANDRY, J., HOUT, J, MARCEAU, F. (1998). Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J. Immunol.* 160: 1419-1426.
- LATZ, E., SCHOENEMEYER, A., VISINTIN, A., FITZGERALD, K.A., MONKS, B.G., KNETTER, C.F., LIEN, E., NILSEN, N.J., ESPEVIK, T., GOLENBOCK, D.T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunol.* 5: 190–198.
- LEGLER, D.F., LOETSCHER, M., JONES, S.A., DAHINDEN, C.A., AROCK, M., e MOSER, B. (1996) Expression of high- and low-affinity receptors for C3a on the human mast cell line, HMC-1. *Eur. J. Immunol.* 26:753.
- LEON JS, ENGMAN DM. (2001) Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol.* 31(5-6):555-61.
- LEON, J.S., ENGMAN, D.M. (2003) The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front. Bioscience.* 8: e315-e322.
- LEVIN, Y., SKIDGEL, R.A., ERDÖS, E.G. (1982) Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase i). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(15):4618-22.
- LIEN, E., SELLATI, T.J., YOSHIMURA, A., FLO, TH., RAWADI,G., FINBERG, RW, CARROLL, JD., ESPEVIK, T., INGALLS, RR., RADOLF, JD., GOLENBOCK, DT. (1999). Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* 274: 33419.
- LIMA AP, SCHARFSTEIN J, STORER AC, MÉNARD R. (1992) Temperature-dependent substrate inhibition of the cysteine proteinase (GP57/51) from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 56(2):335-8.
- LIMA, A.P.C.A., ALMEIDA, P.C., TERSARIOL, I.L.S., SCHMITZ, V. SCHMAIER, A.H., JULIANO, L., HIRAT, I., MULLER-ESTERL, CHAGAS, J.R., SCHARFSTEIN,



J. (2002) Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. *J. Biol. Chem.* 277(8): 5875-5881.

LIMA, A.P.C.A., REIS, F.C.G., SERVEAU, C., LALMANACH, G., JULIANO, L., MÉNARD, R., VERNET, T., THOMAS, D.Y., STORER, A.C., SCHARFSTEIN, J. (2001). Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Mol. Biochem Parasitol.* 114: 41-52.

LIMA, A.P.C.A., TESSIER, D.C., THOMAS, D.Y., SCHARFSTEIN, J., STORER, A.C., VERNET, T. (1994). Identification of new cysteine protease isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67:333-338.

LIMA, M.F., ZHANG, Y., VILLALTA, F. (1997) Beta-chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophages stimulate uptake and promote destruction of *Trypanosoma cruzi* by human macrophages. *Cell Mol Biol.* 43(7):1067-76.

MACEDO, A.M. e PENA, S.D.J. (1998) Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol. Today*, v. 14, p. 119-124.

MACHACA, K. (2003) Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II potentiates store-operated Ca<sup>2+</sup> current. *J Biol Chem.* 278(36):33730-7.

MACHADO, C.A., AYALA, F.J. (2001) Nucleotide sequence provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 7396-7401.

MAGDESIAN, M.H., GIORDANO, R., JULIANO, M.A., JULIANO, L., SCHUMACHER, R.I., COLLI, W., ALVES, M.J.M. (2001). Infection by *Trypanosoma cruzi*: identification of a parasite ligand and its hostcell receptor. *J Biol Chem* 276: 19382–19389.

MALAGA, S., YOSHIDA, N. (2001). Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infect Immun.* 69(1):353-9.

MALAVIYA R, IKEDA, T., ROSS, E., ABRAHAM, S.N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature.* 381:77-80.

- MANDLE, R.J., COLMAN, R.W., KAPLAN, A.P. (1976) Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73(11):4179-83.
- MAÑES, S., DEL REAL, G., MARTÍNEZ-A, C. (2003) Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* Jul;3(7):557-68.
- MARCEAU, F, LARRIVÉE, JF, SAINT-JACQUES, E E BACHVAROV, D.R (1997) The kinin B<sub>1</sub> receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 725-730.
- MARCEAU, F., ADAM, A., HOULE, S., BOUTHILLIER, J., BACHVAROVA, M., BACHVAROV, D.R. (2001) Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. *Biol Chem.* 382(1):131-3.
- MARCEAU, F., HESS, J.F., BACHVAROV, D.R. (1998). The B<sub>1</sub> receptors for kinins. *Pharmacological Reviews* 50(3): 357-386.
- MARIN-NETO, J.A., CUNHA-NETO, E., MACIEL, B.C., SIMÕES, M.V. (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115(9):1109-23.
- MARTIN, U., BOCK, D., ARSENIIEV, L., TORNETTA, M.A., AMES, R.S., BAUTSCH, W., KOHL, J., GANSER, A., e KLOS, A. (1997). The human C3a receptor is expressed on neutrophils and monocytes, but not on B or T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 186:199.
- MASAKI, T., MIWA, S., SAWAMURA, T., NINOMIYA, H., OKAMOTO, Y. (1999) Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol.* 375(1-3):133-8.
- MATHIS, S.A., CRISCIMAGNA, N.L., LEEB-LUNDBERG, L.M. (1996) B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 50(1):128-39.
- MATSUMOTO, H., SUZUKI, N., ONDA, H., FUJINO, M. (1989) Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 74-80.
- MATSUMOTO, M., FUNAMI, K., TANABE, M., OSHIUMI, H., SHINGAI, M., SETO, Y., YAMAMOTO, A., SEYA, T. (2003) Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol.* **171**: 3154–3162.

- MCGRATH ME, EAKIN AE, ENGEL JC, MCKERROW JH, CRAIK CS, FLETTERICK RJ. (1995) The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J Mol Biol.* 247(2):251-9.
- McLEAN, PG., AHLUWALIA, A., PERRETTI, M. (2000). Association between kinin B<sub>1</sub> receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J.Exp. Med.* 192, 3:367-380.
- MEDZHITOV, R. (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145.
- MEDZHITOV, R., C.A. JANEWAY, JR. (1997b) Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 9: 295-298.
- MEIRELLES, M.N., CHIARI, E., DE SOUZA, W. (1982) Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. *Acta Trop.* 39(3):195-203.
- 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.
- MENG, G., RUTZ, M., SCHIEMANN, M., METZGER, J., GRABIEC, A., SCHWANDNER, R., LUPPA, P.B., EBEL, F., BUSCH, D.H., BAUER, S., WAGNER, H., KIRSCHNING, C.J. (2004) Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest.* 113(10):1473-81.
- MENKE, J.G., BORKOWSKI, J.A., BIERLO, K.K., MACNEIL, T., DERRICK, A.W., SCHNECK, K.A., RANSOM, R.W., STRADER, C.D., LINEMEYER, D.L., HESS, J.F., (1994). Expression cloning of a human B<sub>1</sub> bradykinin receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 21583-21586.
- MILES MA, SOUZA A, POVOA M, SHAW JJ, LAINSON R, TOYE PJ. (1978) Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 272(5656):819-21.
- MILES, M. A., M. YEO, AND M. GAUNT. (2003) Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease, p. 1–15. In J. M. Kelly (ed.), *Molecular pathogenesis of Chagas' disease.* Landes Bioscience, Austin, Tex.

- MING, M., CHUENKOVA, M., ORTEGA-BARRIA, E., PEREIRA, M.E.A. (1993). Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and transsialidase on the trypanosome. *Mol Biochem Parasitol* 59: 243–252.
- MING, M., EWEN, M.E, PEREIRA, M.E.A. (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF $\beta$  signaling pathway. *Cell* 82: 287–296.
- MINOPRIO, P.M., EISEN, H., FORNI, L., D'IMPERIO LIMA, M.R., JOSKOWIEZ, M., COUTINHO, A. (1986) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantification of both T-and B-cell responses. *Scand. J. Immunol.* 24: 661-668.
- MINOWA, T., MIWA, S., KOBAYASHI, S., ENOKI, T., ZHANG, X.F., KOMURO, T., IWAMURO, Y., MASAKI, T. (1997) Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel in rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 120(8):1536-44.
- MIYAKE, M. (2003) Innate recognition of lipopolysacchade by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int. Immunopharmacol.* 3(1): 119-128.
- MIYAUCHI, T., MASAKI, T. (1999) Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* 61 391e415.
- MONTEIRO, A.C., SCHMITZ, V., SVENSJO, E., GAZZINELLI, R.T., ALMEIDA, I.C., TODOROV, A., DE ARRUDA, L.B., TORRECILHAS, A.C., PESQUERO, J.B., MORROT, A., BOUSKELA, E., BONOMO, A., LIMA, A.P., MÜLLER-ESTERL, W., SCHARFSTEIN, J. (2006) Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1;177(9):6325-35.
- 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.
- MONTZ H, KOCH KC, ZIERZ R, GÖTZE O. (1991) The role of C5a in interleukin-6 production induced by lipopolysaccharide or interleukin-1. *Immunology.* 74(3):373-9.
- MONTZ, H., KOCH, K.C., ZIERS, R., GOÈ TZE, O. (1991) The role of C5a in interleukin-6 production induced by lipopolysaccharide or interleukin-1. *Immunology* 74: 373-379.

- MORENO, S.N.J., SILVA, J., VERCESI, A.E., DOCAMPO, R. (1994). Cytosolic free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J Exp Med.* 180: 1535–1540.
- MORRIS, S.A., BILEZIKIAN, J.P., HATCHER, V., WEISS, L.M., TANOWITZ, H.B., WITTNER, M. (1989) *Trypanosoma cruzi*: infection of cultured human endothelial cells alters inositol phosphate synthesis. *Exp Parasitol.* 69(4):330-9.
- MORRIS, S.A., HATCHER, V., BILEZIKIAN, J.P., TANOWITZ, H.B., WITTNER, M. (1988) Alterations in intracellular calcium following infection of human endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29:213-221.
- MORRIS, S.A., TANOWITZ, H., MAKMAN, M., HATCHER, V.B., BILEZIKIAN, J.P., WITTNER, M. (1992) *Trypanosoma cruzi*: alteration of cAMP metabolism following infection of human endothelial cells. *Exp Parasitol.* 74(1):69-76.
- MORRIS, S.A., TANOWITZ, H.B., WITTNER, M., BILEZIKIAN, J.P. (1990) Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas disease. *Circulation*, 82: 1900-1909.
- MORTARA RA, SILVA S, ARAGUTH MF, BLANCO SA AND YOSHIDA N. (1992) Polymorphism of the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun* 60: 4673-4678.
- MUKHERJEE, S., HUANG, H., PETKOVA, S.B., ALBANESE, C., PESTELL, R.G., BRAUNSTEIN, V.L., CHRIST, G.J., WITTNER, M., LISANTI, M.P., BERMAN, J.W., WEISS, L.M., TANOWITZ, H.B. (2004) *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Infect. Immun.* 72:5274-5282.
- MUKHERJEE, S., HUANG, H., WEISS, L.M., COSTA, S., SCHARFSTEIN, J., TANOWITZ, H.B. (2003) Role of vasoactive mediators in the pathogenesis of Chagas`disease. *Front. Biosci.* 8:E410-419.
- MULDER, P., RICHARD, V., DERUMEAUX, G., HOGGIE, M., HENRY, J.P., LALLEMAND, F., COMPAGNON, P., MACE COMOY, E., LETAC, B., THUILLEZ, C. (1997) Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 96:1976-1982.

- MULLER L, BARRET A, ETIENNE E, MEIDAN R, VALDENAIRE O, CORVOL P, TOUGARD C. (2003) Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J Biol Chem* 278:545–555.
- MUNOZ, C.M., COTECCHIA, S., LEEB-LUNDBERG, L.M. (1993) B2 kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors. *Arch Biochem Biophys.* 301(2):336-44.
- MUNOZ, C.M., LEEB-LUNDBERG, L.M. (1992). Receptor-mediated internalization of bradykinin. DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. *J Biol Chem.*5;267(1):303-9.
- 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.
- MUZIO, M., MANTOVANI, A. (2000) Toll-like receptors. *Microbes and Infection.* 2: 251-255.
- NADAR, R., DERRICK, A., NAIDOO, Y., HESS, F AND BHOOLA, K. (1996) Immunoreactive B1 receptors in human transbronchial tissue. *Immunopharmacology* 33: 317-320.
- NAICKER, S., BHOOLA, K.D. (2001) Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol. Ther.* 90 61e 88. *Nat Rev Neurosci,* 2(4):274-86.
- NAKANO A, KISHI F, MINAMI K, WAKABAYASHI H, NAKAYA Y, KIDO H. (1997) Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *J Immunol.*159(4):1987-92.
- NATAF, S., DAVOUST, N., AMES, R.S., BARNUM, S.R. (1999) Human T cells express the C5a receptor and are chemoattracted to C5a. *J. Immunol.* 162: 4018-4023.
- NEIRA, I., SILVA, F.A., CORTEZ, M., YOSHIDA, N. (2003). Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 71: 557–561.

- NI, A., CHAO, L., CHAO, J. (1998). Transcription factor nuclear factor NF- $\kappa$ B regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J. Biol. Chem.* 273: 2784-2791.
- NISHIZUKA Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 23;258(5082):607-14.
- NUNES, L.R., DE CARVALHO, M.R., BUCK, G.A. (1997) *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86: 211-224.
- OKAMOTO Y, NINOMIYA H, MIWA S, MASAKI T. (2000) Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 275(9):6439-46.
- OKSCHE A, BOESE G, HORSTMAYER A, FURKERT J, BEYERMANN M, BIENERT M, ROSENTHAL W. (2000) Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol* 57(6):1104-13.
- OLIVEIRA, A.C., PEIXOTO, J.R., ARRUDA, L.B., CAMPOS, M.A., GAZZINELLI, R.T., GOLENBOCK, D.T., AKIRA, S., PREVIATO, J.O., MENDONCA-PREVIATO, L., NOBREGA, A., BELLIO, M. (2004) Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* 173: 5688-5696.
- OLIVEIRA, N.P., BROUDE, N.E., MACEDO, A.M., CANTOR, C.R., SMITH, C.L., PENA, S.D. (1998) Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3776-3780
- ORAWSKI, A.T., SIMMONS, W.H. (1995) Purification and properties of membrane-bound aminopeptidase P from rat lung. *Biochemistry.* 5;34(35):11227-36.
- ORTIZ-ORTIZ, L., ORTEGA, T., CAPIN, R., MARTINEZ, T. (1976) Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 50: 232-242.
- OSAWA, Y., LEE, H.T., HIRSHMAN, C.A., XU, D., EMALA, C.W. (2006) Lipopolysaccharide-induced sensitization of adenylyl cyclase activity in murine macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290(1):C143-51.
- OSTROM, R.S. (2002) New determinants of receptor-effector coupling: trafficking and compartmentation in membrane microdomains. *Mol Pharmacol.* 61(3):473-6.

OTTONELLO, L., CORCIONE, A., TORTOLINA, G., AIROLDI, I., ALBESIANO, E., FAVRE, A., D'AGOSTINO, R., MALAVASI, F., PISTOIA, V., DALLEGRI, F. (1999) rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *J. Immunol.* 162: 6510-6517.

OUAISSI, M.A., CORNETTE, J., CAPRON, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol Biochem Parasitol* 19: 201–211.

OOUASSI, A., GUILVARD, E., DELNESTE, Y., CARON, G., MAGISTRELLI, G., HERBAULT, N., THIEBLEMONT, N., JEANNIN, P. (2002) The *Trypanosoma cruzi* Tc-52-released protein induces human dendritic cell maturation signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J. Immunol.* 168: 6366-6374.

OZINSKY, A., UNDERHILL, D.M., FONTENOT, J.D., HAJJAR, A.M., SMITH, K.D., WILSON, C.B., SCHROEDER, L., ADEREM, A. (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *PNAS USA.* 97(25): 13766-13771.

PAIVA, C.N., SOUTO-PADRON, T., COSTA, D.A., GATTASS, C.R. (1998) High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitology.* 117 ( Pt 5):483-90.

PARISSOS, J.T., VENETSANO, K.F., MENTZIKOF, D.G., KALANTZI, M.V., GEORGOPOULOU, M.V., CHRISTOPOULOS, N., KARAS, S.M. (2001) Plasma levels of soluble cellular adhesion molecules in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. *Eur. Intern. Med.* 12: 350-356.

PEREIRA-CHIOCCOLA. V;L., ACOSTA-SERRANO, A., ALMEIDA, IC., FERGUSON, M.A., SOUTO-PADRON, T., RODRIGUES, M.M., TRAVASSOS, L.R. SCHENCKMAN, S.(2000) Mucin-like molecules from negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J. Cell Sci,* 113: 1299-1307.

PESQUERO, J.B., ARAUJO, R.C., HEPPENSTALL, P.A., STUCKY, C.L., SILVA, J.A. JR., WALTHER, T., OLIVEIRA, S.M., PESQUERO, J.L., PAIVA, A.C., CALIXTO, J.B., LEWIN, G.R., BADER, M. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5;97(14):8140-5.



- PETERSEN, C.A., BURLEIGH, B.A. (2003) Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun.* 71(8):4441-7.
- PETKOVA, S.B., HUANG, H., FACTOR, S.M., PESTELL, R.G., BOUZAHZAH, B., JELICKS, L.A., WEISS, L.M., DOUGLAS, S.A., WITTNER, M., TANOWITZ, H.B. (2001) The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease. *Int J Parasitol.* 1;31(5-6):499-511.
- PETKOVA, S.B., TANOWITZ, H.B., MAGAZINE, H.I., FACTOR, S.M., CHAN, J., PESTELL, R.G., BOUZAHZAH, B., DOUGLAS, S.A., SHTUTIN, V., MORRIS, S.A., TSANG, E., WEISS, L.M., CHRIST, G.J., WITTNER, M., HUANG, H. (2000) Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection *Cardiovasc Pathol.* 9(5):257-65.
- PHAGOO, S.B., POOLE, S., LEEB-LUNDBERG, L.M. (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol.* 56(2):325-33.
- PLUMMER, T.H. JR., HURWITZ, M.Y. (1978) Human plasma carboxypeptidase N. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* 10;253(11):3907-12.
- PREVIATO, J.O., ANDRADE, A.F., PESSOLANI, M.C., MENDONÇA-PREVIATO, L. (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:85-96
- PREVIATO, JO., JONES, C., GONÇALVES, LP., WAIT, R., TRAVASSOS, LR., MENDONÇA-PREVIATO L., (1994) O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 301: 151-159.
- PROCOPIO, O.D., TEIXEIRA, M.M., CAMARGO, M.M., TRAVASSOS, L.R., FERGUSON, MA., ALMEIDA, IC., GAZZINELLI, RT. (1999) Differential inhibitory mechanism of cyclic AMP on TNF-alpha and IL12 synthesis by macrophages exposed to microbial stimuli. *Br. J. Pharmacol.* 127, 1195-1205.
- PUCADYIL, T.J., TEWARY, P., MADHUBALA. R., CHATTOPADHYAY, A. (2004) Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol.* 133(2):145-52.
- RAMIRES, F.J., NUNES, V.L., FERNANDES, F., MADY, C., RAMIRES, J.A. (2003) Endothelins and myocardial fibrosis. *J Card Fail.* 9(3):232-7.

- RAMIREZ, M.I., RUIZ, R.C., ARAYA, J.E., FRANCO DA SILVEIRA, J., YOSHIDA, N. (1993) Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect. Immun.* 61, 3636–41.
- RAWLINGS ND, BARRETT AJ. (1994) Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244:461-86.
- REGOLI, D. (1987). Kinins. *Br Med. Bull.* 43: 270.
- ROCHEVILLE, M., LANGE, D.C., KUMAR, U., PATEL, S.C., PATEL, R.C., PATEL, Y.C. (2000) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science.* 288(5463):154-7.
- ROCK, F.L., HARDIMAN, G., TIMANS, J.C., KASTELEIN, R.A., BAZAN, J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 588-593.
- RODELL, T.C. (1996). The kallikrein/kinin system and kinin antagonists in trauma. *Immunopharmacology* 33, 279-283.
- RODRIGUEZ, A., MARTINEZ, I., CHUNG, A., BERLOT, CH. AND ANDREWS NW. (1999). cAMP regulates  $Ca^{+2}$  dependent exocytosis of lysosomes and lysosome mediated cell invasion by trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 274: 16754-16759.
- RODRÍGUEZ, A., RIOULT, M.G., ORA, A., ANDREWS, N.W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces  $IP_3$  formation, intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* 129: 1263–1273.
- RODRÍGUEZ, A., SAMOFF, E., RIOULT, M.G., CHUNG, A., ANDREWS, N.W. (1996). Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol* 134: 349–362.
- RODRÍGUEZ, A., WEBSTER, P., ORTEGO, J. AND ANDREWS, NW. (1997). Lysosome behave as  $Ca^{+2}$ -regulated exocytic vesicles in fibroblast and epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, 137, 93-104.
- RODRIGUEZ, G.M., DIMENT, S. (1995). Destructive proteolysis by cysteine proteases in antigen presentation of ovalbumin. *Eur. J. Immunol.* 25: 1823-1827.
- ROLLINS TE, SICILIANO S, KOBAYASHI S, CIANCIARULO DN, BONILLA-ARGUDO V, COLLIER K, SPRINGER MS. (1991) Purification of the active C5a receptor from human polymorphonuclear leukocytes as a receptor-Gi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(3):971-5.

- ROLLINS TE, SICILIANO S, KOBAYASHI S, CIANCIARULO DN, BONILLA-ARGUDO V, COLLIER K, SPRINGER MS.(1991) Purification of the active C5a receptor from human polymorphonuclear leukocytes as a receptor-Gi complex *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(3):971-5.
- ROOSTERMAN, D., COTTRELL, G.S., PADILLA, B.E., MULLER, L., ECKMAN, C.B., BUNNETT, N.W., STEINHOFF, M. (2007) Endothelin-converting enzyme 1 degrades neuropeptides in endosomes to control receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(28):11838-43.
- ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. (2000) Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 3(4):395-403.
- ROPERT, C., GAZZINELLI, R.T. (2004) Regulatory role of Toll-like receptor -2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Endotoxin. Res.* 10: 425-430.
- ROSSI, M.A., GONÇALVES, S., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. (1984) Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *Amer. J. Path.* 114: 209-216.
- ROSSI, M.A., PERES, L.C. (1992) Effects of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Amer. Heart J.*, 124: 700-709.
- ROY, P., CHATELLARD, C., LEMAY, G., CRINE, P., BOILEAU, G. (1993) Transformation of the signal peptide/membrane anchor domain of a type II transmembrane protein into a cleavable signal peptide. *J. Biol. Chem.* 268: 2699-704.
- RUBIN-DE-CELIS, S.S., UEMURA, H., YOSHIDA, N., SCHENKMAN, S. (2006) Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell Microbiol.* 8(12):1888-98.
- RUETTEN, H., THIEMERMANN, C. (1997) Endothelin-1 stimulates the biosynthesis of tumour necrosis factor in macrophages: ET-receptors, signal transduction and inhibition by dexamethasone. *J Physiol Pharmacol.* 48(4):675-88.
- RUFFOLO, R (1995) Endothelin receptors from the Gene to the Human. Boca Raton, FL: CRC Press
- RUIZ, R. C., S. FAVORETO, M. L. DORTA, M. E. M. OSHIRO, A. T. FERREIRA, P. M. MANQUE, N. YOSHIDA. (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is

associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signaling activity. *Biochem. J.* 330:505–511.

RUTA, S., PLASMAN, N., ZAFFRAN, Y., CAPO, C., MEGE, J.-L., VRAY, B. (1996). *Trypanosoma cruzi*-induced tyrosine phosphorylation in murine peritoneal macrophages. *Parasitol Res* 82: 481–484.

RYAN, J.S., KELLY, M.E. (1998) Activation of a nonspecific cation current in rat cultured retinal pigment epithelial cells: involvement of a G( $\alpha$  i) subunit protein and the mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Br J Pharmacol.* 124(6):1115-22.

SAAVEDRA, E., HERRERA, M., GAO, W., VEMURA, H., PEREIRA, M.A. (1999) The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulates IL-6 secretion in normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 190: 1825-1836.

SAKAMOTO A, YANAGISAWA M, SAWAMURA T, ENOKI T, OHTANI T, SAKURAI T, NAKAO K, TOYO-OKA T, MASAKI T (1993) Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelinA-selective antagonist and endothelinB-selective agonists. *J Biol Chem.* 268(12):8547-53.

SAKURAI T, YANAGISAWA M, TAKUWA Y, MIYAZAKI H, KIMURA S, GOTO K, MASAKI T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* 348(6303):732-5.

SANTANA, J.M., GRELLIER, P., SCHRÉVEL, J., TEIXEIRA, A.R.A. (1997) *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J.* 1;325 ( Pt 1):129-37.

SANTOS, C.C., SANT'ANNA, C., TERRES, A., CUNHA-E-SILVA, N.L., SCHARFSTEIN, J., LIMA, A.P.C.A. (2005). Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J Cell Sci.*, 118(Pt 5):901-15.

SANTOS, C.C., SCHARFSTEIN, J., LIMA, A.P. (2006) Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa. *Parasitol Res.* 99(4):323-4.

SAYAH S, ISCHENKO AM, ZHAKHOV A, BONNARD AS, FONTAINE M. (1999) Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a

anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J. Neurochem.* 72(6):2426-36.

SCHARFSTEIN, J., SCHMITZ, V., MORANDI, V., CAPELLA, M.M., LIMA, A.P., MORROT A., JULIANO, L., MULLER-ESTERL, W. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J. Exp. Med.* 192:1289-1300

SCHARFSTEIN J. (2003) Activation of Bradykinin Receptors by *Trypanosoma cruzi*: A Role for Cruzipain in Microvascular Pathology. In *Medical Intelligence unit: Molecular Mechanism of Pathogenesis in Chagas disease. Chapter 8* - 113-139. Review

SCHARFSTEIN, J. (2006) Parasite cysteine proteinase interactions with alpha2-macroglobulin or kininogens: differential pathways modulating inflammation and innate immunity in infection by pathogenic trypanosomatids. *Immunobiology.* 211(1-2):117-25. Review

SCHARFSTEIN, J., SCHMITZ, V., SVENSJÖ, E., GRANATO, A., MONTEIRO, A.C. (2007) Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cell maturation. *Scand J Immunol.* 66(2-3):128-36

SCHENKMAN S, FERGUSON MAJ, HEISE N, CARDOSO DE ALMEIDA ML, MORTARA RA AND YOSHIDA N. (1993a) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 59: 293-304.

SCHENKMAN, S., EICHINGER, D. (1993) *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today.* 9(6):218-22.

SCHENKMAN, S., FERGUSON, MA., HEISE, N., DE ALMEIDA ML., MORTARA, RA., YOSHIDA, N. (1993) Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem Parasitol.* 59: 293-303.

SCHENKMAN, S., JIANG, M.S., HART, G.W., NUSSENZWEIG, V. (1991) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* 65 (7);1117-25.

SCHIEFERDECKER, H.L., PESTEL, S., ROTHERMEL, E., PUSCHEL, G.P., GOTZE, O., JUNGERMANN, K. (1998) Stimulation by anaphylatoxin C5a of

glycogen phosphorylase in rathepatocytes via prostanoid release. *FEBS Lett.* 434, 245-250.

SCHINDLER R, GELFAND JA, DINARELLO CA. (1990) Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood.* 76(8):1631-8.

SCHINDLER, R., GELFAND, J.A., DINARELLO, C.A. (1990) Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood* 76: 1631-1638.

SCHLAF, G., SCHIEFERDECKER, H.L., ROTHERMEL, E., JUNGERMANN, K., e GOTZE, O. (1999) Differential expression of the C5a receptor on the main cell types of rat liver as demonstrated with a novel monoclonal antibody and by C5a anaphylatoxin-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Lab. Invest.* 79:1287.

SCHREMMER-DANNINGER, E., OFFNER, A., SIEBECK, M., ROSCHER, A.A. (1998) B1 bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in the aorta of pigs after LPS infusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 4; 243(1):246-52.

SCHWANDNER, R., DZIARSK, R., WESCHE, H., ROTHE, M., KIRSCHINING, C.J. (1999) Peptideglycan and lipoteicoic acid- induced cell activation is mediated by toll-like receptor-2. *J. Biol. Chem.* 274: 17406-17409.

SCHWEIZER A, VALDENAIRE O, NELBÖCK P, DEUSCHLE U, DUMAS MILNE EDWARDS JB, STUMPF JG, LÖFFLER BM. (1997) Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J.* 328 ( Pt 3):871-7.

SCHWEIZER A, VALDENAIRE O, NELBOCK P, DEUSCHLE U, EDWARDS JDM, STUMPF JG, LOFFLER B (1997) Human endothelin converting enzyme (ECE-1): Three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 328: 871–877.

SCOTT, C.F., SILVER, L.D., SCHAPIRA, M., COLMAN, R.W. (1984) Cleavage of human high molecular weight kininogen markedly enhances its coagulant activity. Evidence that this molecule exists as a procofactor. *J Clin Invest.* 73(4):954-62.

SEKO, T., ITO, M., KUREISHI, Y., OKAMOTO, R., MORIKI, N., ONISHI, K., ISAKA, N., HARTSHORNE, D.J., NAKANO, T. (2003) Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res.* 92(4):411-8.

- SEO, B., OEMAR, B.S., SIEBENMANN, R., VON SEGESSER, L., LÜSCHER, T.F. (1994) Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation*. 89(3):1203-8.
- SEVEAU, S., BIERNE, H., GIROUX, S., PRÉVOST, M.C., COSSART, P. (2004) Role of lipid rafts in E-cadherin and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol*. 166(5):743-53.
- SHIMADA K, TAKAHASHI M, IKEDA M, TANZAWA K (1995) Identification and characterization of two isoforms of endothelin converting enzyme-1. *FEBS Lett* 371: 140–144.
- SHIMADA K, TAKAHASHI M, IKEDA M, TANZAWA K. (1995) Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett*. 371(2):140-4.
- SHIMADA, K., YONETANI, Y., KITA, T., SUZUMURA, A., TAKAYANAGI, T., NAKASHIMA, T. (1998) Cyclooxygenase 2 expression by endothelin-1-stimulated mouse resident peritoneal macrophages *in vitro*. *Eur J Pharmacol*. 356(1):73-80.
- SHOHET, R.V., KISANUKI, Y.Y., ZHAO, X.S., SIDDIQUEE, Z., FRANCO, F., YANAGISAWA, M. (2004) Mice with cardiomyocyte-specific disruption of the endothelin-1 gene are resistant to hyperthyroid cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(7):2088-93.
- SICILIANO, S.J., ROLLINS, T.E., DEMARTINO, J., KONTEATIS, Z., MALKOWITZ, L., VAN RIPER, G., BONDY, S., ROSEN, H., SPRINGER, M.S. (1994) Two-site binding of C5a to its receptor: an alternative binding paradigm for G-protein coupled receptors. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 91: 1214-1219.
- SIEBECK, M., SCHORR, M., SPANNAGL, E., LEHNER, M., FRITZ, H., CHERONIS, J.C., WHALLEY, E.T. (1998) B1 kinin receptor activity in pigs is associated with pre-existing infection. *Immunopharmacology*. 40(1):49-55.
- SILBERBERG, S.D., PODER, T.C., LACERDA, A. (1989) Endothelin increases single channel calcium currents in coronary arterial smooth muscle cells. *FEBS Lett*. 247: 68-72.
- SILVA, J.S., VESPA, G.N.R., CARDOSO, M.A.G., ALIBERTI, J.C., CUNHA, F.Q. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- $\gamma$ -activated macrophages. *Infect. Immun*. 63: 4862-4867.

- SIMMONS, W.H., ORAWSKI, A.T. (1992) Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin. *J Biol Chem.* 5;267(7):4897-903.
- SIMONSEN, A., LIPPÉ, R., CHRISTOFORIDIS, S., GAULLIER, J.M., BRECH, A., CALLAGHAN, J., TOH, B.H., MURPHY, C., ZERIAL, M., STENMARK, H. (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature.* 394(6692):494-8.
- SOARES, M.B., PONTES-DE-CARVALHO, L., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc.* 73(4):547-59.
- SOLOMONE, O.A., CACIRO, T.F., MADOERY, R.J., AMICHASTEGUI, M., JURI, D., KASK, J.C. (2001) High plasma immunoreactive endothelin levels in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 87: 1217-1220.
- SOROKIN, A., KOZLOWSKI, P., GRAVES, L., PHILIP, A. (2001) Protein-tyrosine kinase Pyk2 mediates endothelin-induced p38 MAPK activation in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem.* 276(24):21521-8.
- SOUTO, R.P., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., CAMPBELL, D.A., ZINGALES, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83:141-152.
- SPENGLER, R.N., SPENGLER, M.L., LINCOLN, P., REMICK, D.G., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L. (1989) Dynamics of dibutyryl cyclic AMP- and prostaglandin E2-mediated suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha gene expression. *Infect Immun* 57: 2837-2841.
- STAHEL, P.F., FREI, K., EUGSTER, H.P., FONTANA, A., HUMMEL, K.M., WETSEL, R.A., AMES, R., BARNUM, S.R. (1997) TNF- $\alpha$ -mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a (C5aR) on neurons in experimental Listeria meningoencephalitis. *J. Immunol.* 159: 861-869.
- STOLF, B.S., SOUTO, R.P., PEDROSO, A., ZINGALES, B. (2003) Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol.* 126(1):73-80
- STORZ, P., TOKER, A. (2002). 3'-phosphoinositidedependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci.* 7: d886-902.



- SURVEYOR, G.A., BRIGSTOCK, D.R. (1999) Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor (CTGF) in the mouse embryo between days 7.5 and 14.5 of gestation. *Growth factors*. 17: 115-124.
- SUZUKI, E., NAGATA, D., KAKOKI, M., HAYAKAWA, H., GOTO, A., OMATA, M., HIRATA, Y. (1999) Molecular mechanisms of endothelin-1-induced cell-cycle progression: involvement of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase C, and phosphatidylinositol 3-kinase at distinct points. *Circ Res*. 84(5):611-9.
- SVENSJÖ, E., BATISTA, P.R., BRODSKYN, C.I., SILVA, R., LIMA, A.P., SCHMITZ, V., SARAIVA, E., PESQUERO, J.B., MORI, M.A., MÜLLER-ESTERL, W., SCHARFSTEIN, J. (2006) Interplay between parasite cysteine proteases and the host kinin system modulates microvascular leakage and macrophage infection by promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infect*. 8(1):206-20.
- TAKEUCHI, O., KAWAI, T., MUHLRADT, P.F., MORR, M., RADOLF, J.D., ZYCHLINSKY, A., TAKEDA, K., AKIRA, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol*. 13 ( 7); 933-40.
- TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., TAKEDA, K., AKIRA, S. (1999) TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 231: 59-65.
- TALVANI, A., MACHADO, F.S., SANTANA, G.C., KLEIN, A., BARCELOS, L., SILVA, J.S., TEIXEIRA, M.M. (2002) Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun*. 70(8):4247-53.
- TALVANI, A., RIBEIRO, C.S., ALIBERTI, J.C., MICHAILOWSKY, V., SANTOS, P.V., MURTA, S.M., ROMANHA, A.J., ALMEIDA, I.C., FARBER, J., LANNES-VIEIRA, J., SILVA, J.S., GAZZINELLI, R.T. (2000) Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect*. 2(8):851-66.
- TAN, C.M., KELVIN, D.J., LITCHFIELD, D.W., FERGUSON, S.S., FELDMAN, R.D. (2001) Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase. *Biochemistry* 40: 1702-1709.
- TANOWITZ, H.B., GUMPRECHT, J.P., SPURR, D., CALDERON, T.M., VENTURA, M.C., RAVENTOS-SUAREZ, C., KELLIE, S., FACTOR, S.M., HATCHER, V.B.,

- WITTNER, M., BERMAN, J.W. (1992) Cytokine expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Disease*. 166: 598-603.
- TANOWITZ, H.B., HUANG, H., JELICKS, L.A., CHANDRA, M., LOREDO, M.L., WEISS, L.M., FACTOR, S.M., SHTUTIN, V., MUKHERJEE, S., KITSIS, R.N., CHRIST, G.J., WITTNER, M., SHIRANI, J., KISANUKI, Y.Y., YANAGISAWA, M. (2005) Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect Immun*. 73(4):2496-503.
- TANOWITZ, H.B., KAUL, D.K., CHEN, B., MORRIS, S.A., WEISS, L.M., WITTNER, M. (1996) Compromised microcirculation in acute murine *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Parasitol*. 82: 124-30.
- TANOWITZ, H.B., WITTNER, M., MORRIS, S.A., ZHAO, W., WEISS, L.M., HACHTER, S.A., BRAUNSTEIN, V.L., HUANG, H., DOUGLAS, S.A., VALCIC, M., SPEKTOR, M., CHRIST, G.J. (1999) The putative mechanistic basis for modulatory role of endothelin-1 in the altered vascular tone induced by *Trypanosoma cruzi*. *Endothelium*. 6:217-230.
- TARDIEUX, I., NATHANSON, M.H., ANDREWS, N.W. (1994). Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free  $Ca^{2+}$  transients. *J Exp Med* 179: 1017–1022.
- TARDIEUX, I., WEBSTER, P., RAVESLOOT, J., BORON, W., LUNAN, J.A. HEUSER, J.E., ANDREWS, N.W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, 73: 1117–1130.
- TARLETON, R. L. (2001) Parasite persistence in the ethiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol*. 31:550-554.
- TEIXEIRA, M.M., GAZZINELLI, R.T., SILVA, J.S. (2002) Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 18(6):262-5.
- THASTRUP, O., CULLEN, P.J., DRØBAK, B.K., HANLEY, M.R., DAWSON, A.P. (1990) Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(7):2466-70.
- THOMPSON, R.E., MANDLE, R. JR., KAPLAN, A.P. (1977) Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest*. 60(6):1376-80.

- TIBAYRENC, M. (2003) Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2(1):12.
- TODESCHINI, A.R., NUNES, M.P., PIRES, R.S., LOPES, M.F., PREVIATO, J.O., MENDONCA-PREVIATO, L., DOS REIS, G.A. (2002) Coestimulation of host T lymphocyte by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J. Immunol.* 168: 5192-5198.
- TODOROV, A.G., ANDRADE, D., PESQUERO, J.B., ARAUJO, R. DE C., BADER, M., STEWART, J., GERA, L., MULLER-ESTERL, W., MORANDI, V., GOLDENBERG, R.C., NETO, H.C, SCHARFSTEIN J. (2003) *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells *in vitro* by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. *FASEB J.* 17:73-75.
- TODOROV, A.G., EINICKER-LAMAS, M., DE CASTRO, S.L., OLIVEIRA, M.M., GUILHERME, A. (2000). Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem* 275: 32182–32186.
- TOKER, A., CANTLEY, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673–676.
- TOMÁS, 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.
- TOMLINSON, S., VANDEKERCKHOVE, F., FREVERT, U., AND NUSSENZWEIG, V. (1995) The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigote transformation by low pH. *Parasitology.* 110: 547-554.
- TORRICO, F., HEREMANS, H., RIVIERA, M.T., VAN, M.E., GAZZINELLI, R.T., VIEIRA, L.Q., SILVA, J.S. (1991) Endogenous IFN- $\gamma$  is required for resistance of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to complement. *J. Immunol.* 146: 3626-3632.
- TREVISI, L., BOVA, S., CARGNELLI, G., CELOTTI, G., LUCIANI, S. (2002) Endothelin-1-induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway. *Biochem Pharmacol.* 64(3):425-31.
- TURNER AJ, BARNES K, SCHWEIZER A, VALDENNAIRE O (1998): Isoforms of endothelin converting enzyme: Why and where? *TIPS* 19: 483–486.

- TYLER K.M., LUXTON, G.W.G., APPLEWHITE, D.A., MURPHY, S.C., ENGMAN, D.M. (2005) Responsive microtubules dynamics promote cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Microbiology*.7:(11):1579-91.
- UNDERHILL, D.M, OZINSKY, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 14; 103-10.
- UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A., HAJJAR, A.M., STEVENS, A., WILSON, C.B., BASSETTI, M., ADEREM, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 21: 401 (6755); 811-5.
- VACCA, F., BAGNATO, A., CATT, K.J., TECCE, R. (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*. 60(18):5310-7.
- VAGO, A.R., MACEDO, A.M., OLIVEIRA, R.P., ANDRADE, L.O., CHIARI, E., GALVÃO, L.M., REIS, D., PEREIRA, M.E., SIMPSON, A.J., TOSTES, S., PENA, S.D. (1996) Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*. 149(6):2153-9.
- VALDENNAIRE O, ROHRBACHER E, MATTEI MG. (1995) Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem*. 270(50):29794-8.
- VARGA, E.V., YAMAMURA, H.I., RUBENSIK, M.K., STROPOVA, D., NAVRATILOVA, E., ROESKE, W.R. (2003) Molecular mechanisms of excitatory signaling upon chronic opioid agonist treatment. *Life Sci* 74: 299-311.
- VESPA, G.N.R., CUNHA, F.Q., SILVA, J.S. (1994) Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills parasite *in vitro*. *Infect. Immun*. 62: 5177-5182.
- VIEIRA, M.C., DE CARVALHO, T.U., DE SOUZA, W. (1994). Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Comm* 203: 967–971.
- VILLALTA, F., ZHANG, Y., BIBB, K.E., BURNS, J.M. JR., LIMA, M.F. (1998a). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 249(1):247-52.

- VILLALTA, F., ZHANG, Y., BIBB, K.E., KAPPES, J.C., LIMA, M.F. (1998b) The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun.* 66(10):4690-5.
- VILLALTA, F., ZHANG, Y., BIBB, K.E., PRATAP, S., BURNSJR, J.M., LIMA, M.F. (1999). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulated trypanosome entry through protein kinase C activation. kilodalton surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 39: 39–46.
- VISINTIN, A., MAZZONI, A., SPITZER, J.H., WYLLIE, D.H., DOWER, S.K., SEGAL, D.M. (2001) Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 1: 166 (1); 249-55.
- WAGHABI, M.C., KERAMIDAS, M., BAILLY, S., DEGRAVE, W., MENDONÇA-LIMA, L., SOEIRO, MDE N, MEIRELLES, M de N., PACIORNIK, S., ARAÚJO-JORGE, T.C., FEIGE, J.J. (2005) Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes: potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol.* 167(4):993-1003.
- WANG, H., STORM, D.R. (2003) Calmodulin-regulated adenylyl cyclases: cross-talk and plasticity in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 63: 463-468.
- WARNER T. D., BATTISTINI B., ALLCOCK G. H., VANE J. R. (1993) *Eur. J. Pharmacol.*, **250**, 447—453
- WERFEL, T., ZWIRNER, J., OPPERMAN, M., SIEBER, A., BEGEMANN, G., DROMMER, W., KAPP, A., GOÈ TZE, O. (1996) CD88 antibodies specifically bind to C5aR on dermal CD117<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup> cells and react with a desmosomal antigen in human skin. *J. Immunol.* 157, 1729-173.
- 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.
- WICKMAN, K., CLAPHAM, D.E, (1995) Ion channel regulation by G proteins. *Physiological Reviews.* 75: 865-885.
- WILKOWSKY, S.E., BARBIERI, M.A., STAHL, P., ISOLA, E.L. (2001). *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res* 264: 211–218.

- WILKOWSKY, S.E., WAINSELBAUM, M.J., ISOLA, E.L. (1996) *Trypanosoma cruzi*: participation of intracellular Ca<sup>2+</sup> during metacyclic trypomastigote-macrophage interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 15;222(2):386-9.
- WILMER, W.A., KAUMAYA, P.T., EMBER, J.A., COSIO, F.G. (1998) Receptors for the anaphylatoxin C5a (CD88) on human mesangial cells. *J. Immunol.* 160: 5646-5652.
- WITTMANN M, LARSSON VA, SCHMIDT P, BEGEMANN G, KAPP A, WERFEL T. (1999) Suppression of interleukin-12 production by human monocytes after preincubation with lipopolysaccharide. *Blood.* 94(5):1717-26.
- WITTMANN, M., ZWIRNER, J., LARSSON, V.-A., KIRCHHOFF, K., BEGEMANN, G., KAPP, A., GOÈTZE, O., WERFEL, T. (1999) C5a suppresses the production of IL-12 by human monocytes. *J. Immunol.* 162: 6763-6769.
- WITTNER, M., CHRIST, J.G., HUANG, H., WEISS, L.M., HACHTER, S.A., MORRIS, S.A., ORR, G.A., BERMAN, J.W., ZEBALLOS, G.A., DOUGLAS, S.A., TANOWITZ, H.B. (1995) *Trypanosoma cruzi* induces endothelin release from endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 171:493-497.
- WOOLSEY, A.M., BURLEIGH, B. (2004). Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol* 6: 829–838.
- WOOLSEY, A.M., SUNWOO, L., PETERSEN, C.A., BRACHMANN, S.M., CANTLEY, L.C., BURLEIGH, B.A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci* 116: 3611–3622.
- WYPIJ DM, NICHOLS JS, NOVAK PJ, STACY DL, BERMAN J, WISEMAN JS. (1992) Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochem Pharmacol.* 43(4):845-53.
- XU, D., EMOTO, N., GIAID, A., SLAUGHTER, C., KAW, S., DEWIT, D., YANAGISAWA, M. (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell.* 12;78(3):473-85.
- YAKUBU, M.A., MAJUMDER, S., KIERSZENBAUM, F. (1994) Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affect calcium ion levels. *Mol Biochem Parasitol.* 66(1):119-25.
- YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., UEMATSU, S., HOSHINO, K., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., AKIRA, S. (2003) TRAM is specifically involved

in the toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4(11): 1144-1150.

YAMAMOTO, M., SATO, S., MORI, K., HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., AKIRA, S. (2002) Cutting Edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169(12): 6668-6672.

YANAGISAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K., MASAKI, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332: 411-415.

YANCEY, P.G., RODRIGUEZA, W.V., KILSDONK, E.P., STOUT, G.W., JOHNSON, W.J., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G.H. (1996) Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J Biol Chem.* 271(27):16026-34.

YANG, R.B., MARK, M.R., GRAY, A., HUANG, A., XIE, M.H., ZHANG, M., GODDARD, A., WOOD, W.I., GURNEY, A.L., GODOWSKI, P.J. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature.* 17: 395 (6699); 284-8.

YAYAMA, K., NAGAOKA, M., TAKANO, M., OKAMOTO, H. (2000). Expression of kininogen, kallikrein and kinin receptor genes by rat cardiomyocytes. *Biochem. et Biophys. Acta* 1495: 69-77.

YEPENG, L., WENFANG, X. (2007) The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem.* 14(6):639-47.

YONEYAMA, K.A., TANAKA, A.K., SILVEIRA, T.G., TAKAHASHI, H.K., STRAUS, A.H. (2006) Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains and their role in macrophage infectivity. *J Lipid Res.* 47(10):2171-8.

YOSHIDA, N. (2006) Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78(1):87-111.

YOSHIDA, N., FAVORETO, S. JR., FERREIRA, A.T., MANQUE, P.M. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res.* 33(3):269-78.

YOSHIMURA, A., LIEN, E., INGALLS, R.R., TUOMANEN, E., DZIARSKI, R., GOLENBOCK, D. (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell

wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 1: 163 (1); 1-5.

ZHANG, G., GHOSH, S. (2002) Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277 (9): 7059-65.

ZHANG, L., AND TARLETON, R.L. (1996). Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol* 26: 102–109.

ZHANG, L., TARLETON, R.L. (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis.* 180(2):480-6.

ZHANG, X.F., KOMURO, T., MIWA, S., MINOWA, T., IWAMURO, Y., OKAMOTO, Y., NINOMIYA, H., SAWAMURA, T., MASAKI, T. (1998) Role of nonselective cation channels as Ca<sup>2+</sup> entry pathway in endothelin-1-induced contraction and their suppression by nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 10; 352(2-3):237-45.

ZINGALES B, STOLF BS, SOUTO RP, FERNANDES O, BRIONES MR. (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:159-64.

ZUCCARELLO, M., BOCCALETTI, R., TOSUN, M., RAPOPORT, R.M. (1996) Role of extracellular Ca<sup>2+</sup> in subarachnoid hemorrhage-induced spasm of the rabbit basilar artery. *Stroke* 27(10):1896-902.

ZWIRNER J, FAYYAZI A, GÖTZE O. (1999) Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells. *Mol Immunol.* 36(13-14):877-84.

ZWIRNER, J., GOTZE, O., BEGEMANN, G., KAPP, A., KIRCHHOFF, K., e WERFEL, T. (1999) Evaluation of C3a receptor expression on human leukocytes by the use of novel monoclonal antibodies. *Immunology* 97:166.



# 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](#)