

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**  
**(Bioquímica)**

Viviana Barbosa Paes

**Expressão de componentes da matriz extracelular  
induzida por vesículas de *Trypanosoma cruzi* liberadas  
no meio de cultura.**

**São Paulo**  
**Data do Depósito na SPG:**  
**30/julho/2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Viviana Barbosa Paes

**Expressão de componentes da matriz extracelular  
induzida por vesículas de *Trypanosoma cruzi* liberadas  
no meio de cultura.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências (Bioquímica).*

*Orientador: Prof. Dr. Walter Colli*

**São Paulo**

**2008**

**Viviana Barbosa Paes**

**Expressão de componentes da matriz extracelular induzida por vesículas de *Trypanosoma cruzi* liberadas no meio de cultura.**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Walter Colli e à Professora Dra. Maria Julia Manso Alves pela orientação e paciência.

Ao pessoal do laboratório: Prof. Ivan, Nathalie, Pablo, Suzana, Vinícius e Anderson obrigado pela ajuda, conselhos e momentos de descontração. Agradeço em especial a Celinha, Marinei e o Robertinho por toda ajuda e conselhos que levarei pelo resto da vida.

Um agradecimento especial a duas pessoas fundamentais em minha formação: Ana Cláudia e Renata. Obrigada por tudo que vocês me ensinaram, pela paciência, pelas risadas e pelos conselhos.

Aos amigos que fiz no Instituto de Química: Heloísa, Michelle, Guilherme, JR e Pererê. Obrigada pelas risadas, conversas e pelo apoio, levarei vocês sempre em meus pensamentos. E agradeço também a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte da minha vida durante esses anos de mestrado.

À minha família que é meu porto seguro e tudo na minha vida.

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida para minha formação.

*"The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not 'Eureka!' (I found it!) but 'That's funny...'"*

Isaac Asimov

## RESUMO

Paes, V.B. **Expressão de componentes da matriz extracelular induzida por vesículas de *Trypanosoma cruzi* liberadas no meio de cultura**. 2008. 89p. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O *Trypanosoma cruzi* libera para o meio, vesículas contendo material de sua superfície e aparentemente estas vesículas seriam uma maneira de ativar e preparar a célula hospedeira para a invasão, além de induzir um aumento na expressão de alguns componentes da matriz extracelular. Neste trabalho demonstramos que essas vesículas aumentam a expressão de fibronectina na matriz, sendo este aumento dose-dependente e linear ao longo do tempo. Porém, para laminina não conseguimos observar o mesmo comportamento. Nossos resultados também mostram que os constituintes lipídicos das vesículas podem ser os responsáveis pelo aumento da expressão de fibronectina em cultura de células epiteliais. Os dois grandes grupos de glicoproteínas encontradas na superfície do parasita e nas vesículas, mucinas e Tc85 não parecem estar envolvidos no processo. As culturas celulares tratadas com os lipídeos extraídos das vesículas apresentaram um aumento de fibronectina também dose-dependente, porém, com uma resposta linear ao longo do tempo e uma expressão máxima atingida em tempos menores.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, matriz extracelular, vesículas, lipídeos.



## ABSTRACT

Paes, V.B. **Expression of extracellular matrix components by vesicles of *Trypanosoma cruzi* shed into the culture medium.** 2008. 89p. Masters Thesis - Graduate Program Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

*Trypanosoma cruzi* releases to the environment plasma membrane vesicles. Apparently, these vesicles could be a signal released by the parasite to prepare the host cell for the invasion. This study demonstrated that these vesicles induce a dose-dependent expression of fibronectin, linear over time. The same behavior has not been observed for laminin. Our results also show that lipids from the vesicles are involved in the increase of expression of fibronectin by epithelial cells. The two major surface membrane glycoproteins, Tc85 and mucins, also present in the vesicles do not participate in this phenomenon. Cell cultures that have been treated with lipids extracted from *T. cruzi* membrane vesicles also provoked a dose-dependent increase in fibronectin and linear over time.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, extracellular matrix, vesicles, lipids

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DMEM</b>	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium” – Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EGTA</b>	Etilenoglicol bis aminoetileter
<b>IPTG</b>	Isopropil $\beta$ - D tiogalactopiranosideo
<b>LLC-MK<sub>2</sub></b>	Linhagem celular mantida em cultura e derivada de células epiteliais de rim de macaco Rhesus
<b>MOPS</b>	3 – (n-morpholino) Propane Sulfonic acid.
<b>PBS</b>	“Phosphate buffered saline – Tampão fosfato de sódio
<b>PIPES</b>	Piperazina N N’ bis (2 etanosulfônico)
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonil fluoreto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>TBS-TT</b>	Tampão Tris contendo triton X-100 e tween 20
<b>TLCK</b>	N-tosil-L-lisinaclorometilcetona
<b>TS</b>	Trans-sialidase

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Ciclo de vida e a Interação parasita-célula.....	12
1.2 As vesículas liberadas pelo parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
1.3 Mucinas.....	17
1.4 A Superfamília das gp85/trans-sialidases.....	18
1.5 O grupo TC-85.....	19
1.6 A Matriz Extracelular.....	21
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Preparação de bactérias competentes.....	30
3.2 Mini-preparações de DNA plasmidial.....	31
3.3 Purificação da proteína recombinante Tc-85 por cromatografia de afinidade.....	32
3.4 Cultura de células.....	33
3.5 Separação das frações solúvel e insolúvel de cultivos de células LLC-MK <sub>2</sub> ..	34
3.6 Contagem de células em divisão.....	35
3.7 Imunocitoquímica.....	35
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	36
3.9 Western Blot.....	37
3.10 Padronização das figuras de Western Blot.....	37
3.11 Obtenção de vesículas liberadas pelo parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	38

	10
3.12 Extração de glicolipídeos.....	38
2.13 Obtenção dos peptídeos sintéticos e mucinas.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Obtenção da proteína Tc-85.....	40
4.2 Efeito da vesícula, Tc-85, e peptídeo J na expressão de Matriz Extracelular.	
41	
4.2.1 Por Imunocitoquímica.....	41
4.2.2 Por Western blot – Fração Total.....	45
4.2.3 Por Western blot – Frações solúvel e insolúvel.....	47
4.3 Vesículas, Tc85-45 e peptídeo J não induzem a divisão celular.....	50
4.4 Efeito dos componentes da vesícula na expressão de fibronectina.....	51
4.4.1 Por Imunocitoquímica.....	51
4.4.2 Por Western blot – frações solúvel e insolúvel.....	54
4.5 Expressão de fibronectina ao longo do tempo.....	57
4.5 Dose-Resposta.....	62
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8. ANEXO.....	87

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas inicialmente era uma doença enzoótica selvagem, mas passou a ser uma antropozoonose quando o homem invadiu as regiões de florestas e ocupou o espaço físico dos animais que são reservatórios e dos insetos vetores que se adaptaram ao modo de vida do homem passando, assim, a infectá-los acidentalmente (Coura 2007).

O parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Tripanosomíase Americana, descrita por Carlos Chagas em 1909. É uma doença endêmica que atinge 18 países das Américas com, aproximadamente, 120 milhões de pessoa expostas ao risco de infecção representando, portanto, um importante problema de saúde pública. As estatísticas apontam 300 mil novos casos e cerca de 20 mil mortes por ano e acredita-se que haja atualmente entre 16 a 18 milhões de pessoas infectadas. Apesar dos números ainda serem alarmantes, muito se tem feito para o controle da doença e nos países como Uruguai e Chile e em alguns estados do Brasil e da Argentina, a doença foi considerada erradicada (Moncayo 1999; [www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm)). No entanto, as micro-epidemias recentes por infecção oral mostram a existência de parasitas na natureza interagindo com o homem.

A principal via de infecção em seres humanos e em outros vertebrados se dá pelo contato da pele ou mucosas com dejetos de insetos hematófagos. Estes insetos vetores pertencem à família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo as

principais espécies: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Lent & Wygodzinsky 1979). A transfusão de sangue de doadores contaminados também é uma via de contaminação importante (WHO 1997), sendo a transmissão congênita (por meio da placenta e amamentação) é uma via relativamente menor (Nisida *et al.* 1999; Díaz 1979). Na Amazônia brasileira, entre 1968 e 2000, mais da metade dos casos está relacionada com micro-epidemias por transmissão via oral, ou seja, pela ingestão de alimentos contaminados por triatomídeos infectados ou seus dejetos (Prata 2001; Coura *et al.* 2007). Outros casos foram descritos em outras regiões brasileiras provavelmente pela presença de insetos contaminados em açaí ou cana-de-açúcar quando estes alimentos foram preparados para consumo humano, como foi, por exemplo, o caso da contaminação por caldo de cana no Estado de Santa Catarina em março de 2005.

### **1.1 Ciclo de vida e a interação parasita-célula**

O ciclo de vida do parasita *Trypanosoma cruzi* é complexo e é caracterizado por vários estágios de desenvolvimento morfológica e funcionalmente distintos. O ciclo envolve um hospedeiro vertebrado (várias espécies de mamíferos) e um hospedeiro invertebrado (triatomídeos) (Figura 1).

Os estágios de desenvolvimento são baseados na morfologia do parasita, bem como na posição do cinetoplasto com relação ao núcleo e à região onde emerge o flagelo, sendo:

**Amastigotas** – Formas arredondadas de 3 – 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro com núcleo esférico e central e cinetoplasto localizado na porção anterior do parasita. São encontradas no citoplasma de células do hospedeiro vertebrado, em culturas celulares ou obtidas em meio axênico. São formas reprodutivas multiplicando-se por divisão binária com capacidade de invasão quando ocorre ruptura prematura da célula hospedeira propagando a infecção (Ley *et al.* 1988; Mortara 1991; Mortara *et al.* 2005). No caso do intestino do inseto, formas semelhantes aos amastigotas também foram descritas, as chamadas esferomastigotas (Tyler & Engman 2001).

**Epimastigotas** – São formas proliferativas que não apresentam capacidade de infecção. Medem de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de comprimento, com cinetoplasto localizado em região anterior ao núcleo e flagelo emergente da porção lateral da bolsa flagelar. Estão presentes no tubo digestivo do inseto vetor e na fase logarítmica do crescimento do parasita em meio axênico. São formas também encontradas em células do hospedeiro vertebrado durante o ciclo intracelular, embora de tamanho cinco vezes menor, denominadas epimastigotas intracelulares (Almeida-de-Faria *et al.* 1999).

**Tripomastigotas** – Formas observadas no sangue (tripomastigotas sanguícolas), no espaço extracelular do hospedeiro vertebrado, na porção terminal do intestino do inseto vetor (tripomastigota metacíclico), bem como em seus dejetos (fezes e urina), em culturas de células e na fase estacionária de crescimento em meio axênico. Apresentam 25  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2  $\mu\text{m}$  de largura, com o cinetoplasto localizado em região posterior ao núcleo e um longo flagelo que emerge lateralmente da bolsa flagelar. Os tripomastigotas são as formas infectivas e não apresentam capacidade de proliferação.

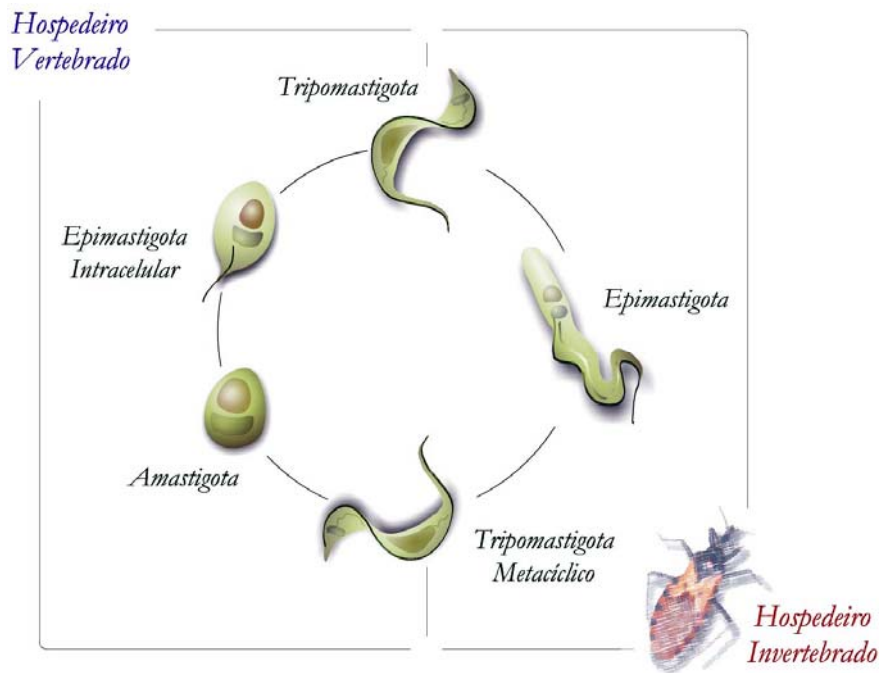


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (Tonelli, 2003)

O ciclo evolutivo do parasita tem início quando um inseto vetor, ao se alimentar, elimina junto com as fezes formas tripomastigotas metacíclicas que entram em contato com o local lesado pela picada. A forma tripomastigota é capaz de invadir todos os tipos de células, com exceção da hemácia. Aparentemente, em menor número de casos, este processo de invasão envolve recrutamento de lisossomos - realizado por microtúbulos do citoesqueleto de células epiteliais e de fibroblastos - e sua fusão com o vacúolo parasitóforo (Schenkman *et al.* 1992; Tardieux *et al.* 1992 e 1994; Andrews 1994; Rodriguez *et al.* 1996), formando, assim, um vacúolo ácido (Tardieux *et al.* 1992). Outro mecanismo, de invasão, que ocorre em maior escala, se dá por invaginação da membrana plasmática formando um vacúolo - dependente de fosfatidilinositol-3 quinase (PI-Kinase) e independente de actina (De Sousa 2002; Burleigh & Woosley 2004) - e subsequente fusão com



lisossomos (Woolsey *et al.* 2003). Após um dos dois eventos de entrada do parasita na célula, os tripomastigotas escapam do vacúolo e ocorre a diferenciação de tripomastigota para amastigota que começam o processo de multiplicação e após diversas divisões, as formas amastigotas se diferenciam em um estágio intermediário, o epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria *et al.* 1999) e depois em tripomastigotas, quando ocorre a lise celular liberando-os para o meio extracelular, podendo então invadir células vizinhas, ir para a corrente sanguínea e atingir outros tecidos ou ainda infectar um inseto vetor durante o processo de hematofagia, recomeçando o ciclo no hospedeiro invertebrado.

No hospedeiro invertebrado as formas tripomastigotas ao chegarem ao tubo digestivo se diferenciam em epimastigotas e migram para o intestino onde ocorre a divisão binária. Ao atingirem a porção terminal do tubo digestivo, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são eliminados juntamente com as fezes e urina do triatomídeo (Brener 2002).

Para que ocorra o sucesso da infecção e da disseminação, estão envolvidos processos de adesão e invasão que requerem interações entre moléculas de superfície do parasita com a célula hospedeira seguidas de eventos intracelulares. Estes mecanismos ainda são pouco compreendidos, porém já se conhecem algumas moléculas envolvidas nestes processos, entre elas, alguns membros de um grupo de glicoproteínas ancoradas via glicosilfosfatidilinositol (GPI), pertencentes à superfamília gp85/trans-sialidases (Colli, 1993; Cross & Takle, 1993; Frasch 2000; Acosta-Serrano *et al.* 2001; Yoshida 2005; Alves e Colli 2007). Na literatura, alguns representantes desta superfamília estão bem caracterizados como a gp82, presentes em tripomastigotas metacíclicos, que ativa uma proteína tirosina quinase (PKT) e aumenta a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular. Aparentemente, a gp82 se liga

a mucinas gástricas podendo ser um fator importante no sucesso da infecção via oral (Sartori *et al.* 1996; Neira *et al.* 2003, Yoshida 2005). Ademais, propõe-se que a gp82 liga-se a receptores de mioblastos, macrófagos e fibroblastos, mediando a entrada do parasita na célula (Villalta *et al.* 2001) e uma família composta de várias moléculas de 85 kDa de formas tripomastigotas infectantes, denominada Tc-85, parece estar relacionada com a adesão do parasita na célula hospedeira (Alves 1996; Giordano *et al.* 1999; Magdesian *et al.* 2001; Marroquin-Quelopana *et al.* 2004).

## **1.2 As vesículas liberadas pelo parasita *Trypanosoma cruzi***

A liberação de vesículas e moléculas para o meio é um mecanismo comum em diferentes células, incluindo parasitas como tripanosomatídeos africanos (Seyfang *et al.* 1990), *Plasmodium* sp (Blackman & Holder 1992) e *Leishmania* sp (Ilg *et al.* 1995). *L. donovani* secreta vesículas para o meio com cerca de 150 tipos de proteínas que apresentam um peptídeo de sinalização de secreção em sua região N-terminal e são liberadas por múltiplos processos, como, por exemplo, através de microvesículas via exossomos (Silverman *et al.* 2008). O *T. cruzi* libera para o meio vesículas contendo material de sua superfície (Gonçalves *et al.* 1991). Aventou-se a hipótese que estas vesículas seriam uma maneira de ativar e preparar a célula hospedeira para a invasão.

Em meio de cultura, a forma tripomastigota do parasita *T. cruzi* libera vesículas de variados tamanhos medindo entre 20 a 80 nm (Gonçalves *et al.* 1991). Apresentam em sua composição glicoproteínas presentes na superfície do parasita, como as mucinas, as trans-sialidases e o grupo Tc-85, algumas fosfatases e

proteases (M.J.M Alves *et. al* dados não publicados). As vesículas contêm também lipídeos como fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, ácidos graxos saturados (C<sub>16:0</sub> e C<sub>18:0</sub>) e é rica em ácidos graxos insaturados (C<sub>16:1</sub> e C<sub>18:1</sub>) (Agusti *et al.* 2000).

É importante ressaltar que as vesículas induzem um aumento mortalidade em camundongos suscetíveis (R. Tonelli e A.T. Torrecilhas, comunicação pessoal). Além disso, Pinho *et al.* em 2002, usando imunocitoquímica, sugerem um aumento da expressão de laminina, fibronectina e colágeno na matriz extracelular, em células epiteliais (LLC-MK<sub>2</sub>) e fibroblastos (L929) por incubação com vesículas de *T. cruzi*.

### 1.3 Mucinas

Mucinas são glicoproteínas com oligossacarídeos O-ligados, presentes na superfície de células epiteliais do aparelho digestivo e respiratório de animais e na superfície de parasitas, entre eles o *Trypanosoma cruzi*. As mucinas teriam um papel defensivo para o parasita contra a resposta imune do hospedeiro, tendo assim papel de proteção (Buscaglia *et al.* 2006).

O maior grupo de glicoproteínas encontradas na superfície do *T. cruzi*, ancoradas via glicosilfosfatidilinositol (GPI), são as mucinas que apresentam cerca de 50-200 aminoácidos e grande porcentagem de carboidratos ligados, o que lhes confere um caráter hidrofílico (Schenkman *et al.* 1993; Previato *et al.* 1994). As mucinas, encontradas em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, apresentam peso molecular de 35-50 KDa e uma composição muito semelhante de aminoácidos e carboidratos com papel protetor contra proteases presentes no trato intestinal do inseto vetor, principalmente para os epimastigotas (Mortara *et al.* 1992; Acosta-

Serrano *et al.* 2001). Nos tripomastigotas metacíclicos as mucinas também foram relacionadas com a adesão e a invasão do parasita na célula (Ruiz *et al.* 1993). Em formas tripomastigotas de cultura as mucinas possuem peso molecular de 60-200 KDa e apresentam o epítopo Ssp-3 que contém ácido siálico que é importante para o sucesso da adesão e invasão do parasita na células (Schenkman *et al.* 1991).

#### **1.4 A superfamília das gp85/trans-sialidases**

As trans-sialidases (TS) são proteínas expressas em diferentes formas do parasita, principalmente em tripomastigotas, que não apresentam a reação típica encontrada na maioria das sialidases, que são enzimas hidrolíticas presentes em vírus e eucariotos superiores (Buschiazzo *et al.* 1997). As TS transferem especificamente ácido siálico de glicoconjugados da célula hospedeira para glicoconjugados da membrana de *T. cruzi*. (Colli 1993; Yoshida 2005), sendo o principal acceptor a mucina (Schenkman & Eichinger 1993).

A superfamília das TS apresenta membros heterogêneos com massa molecular variando de 60-80 até 200 kDa (Colli 1993). O genoma de *T. cruzi* contém centenas de genes que codificam para as trans-sialidases e proteínas homólogas sem atividade enzimática (Egima *et al.* 1996). Ao término do seqüenciamento genético do *T. cruzi*, foram listados 1.439 genes para a superfamília da gp85/trans-sialidase sendo 693 pseudogenes (El-Sayed *et al.* 2005). Os membros da família TS podem ser classificados em grupos de acordo com a estrutura e a função das proteínas. A classificação, segundo Frasch 2000, divide os membros das trans-sialidases em quatro famílias distintas descritas abaixo:

**TS e TSI** – São expressas em tripomastigotas e tripomastigotas metacíclicos. Apresentam duas principais regiões, uma catalítica na porção N-terminal, e outra na região C-terminal com repetições de 12 aminoácidos (repetições SAPA – *shed acute-phase antigen*) *in tandem*. Estes dois grupos diferenciam-se em apenas uma mutação, Tyr342-His, tornando a família TSI enzimaticamente inativa;

**TS-e** – Estes genes são expressos em epimastigota, não apresentam as repetições SAPA e apresentam o motivo FRIP na região N-terminal, o que lhes permite codificar trans-sialidase ativa.

**TS-like** – Os membros desta família são encontrados na superfície de tripomastigotas (metacíclicos ou de cultura) e amastigota. Não possuem atividade enzimática apesar das proteínas codificadas por estes genes apresentarem 30-40% de identidade quando comparadas com os membros das TSs. O seqüenciamento do genoma do *T.cruzi* demonstra que mais de 725 genes codificam TS-like com vários graus de homologia com as TSs, mas apenas 371 genes apresentam o motivo VTVxNVfLYNR, que é conservado na superfamília das Trans-sialidasas. Essa variedade de seqüências sugere uma forte pressão seletiva sofrida pelos membros desta família em resposta ao sistema imunológico do hospedeiro. (El-Sayed *et al.* 2005). Embora não se saiba ainda se todas as proteínas correspondentes a este grande número de genes são expressas na população de parasitas, sabe-se que cada indivíduo da população expressa mais do que uma isoforma da superfamília trans-sialidase.

### 1.5 O grupo Tc-85

O grupo da Tc85 pertence à superfamília gp85/trans-sialidasas, pois apresenta pelo menos um motivo da seqüência conservada ASP Box e a seqüência

VTVXNVXLYNR no domínio carboxila terminal (domínio FLY) (Figura 2) (Colli 1993; Cross e Takle 1993; Schenkman *et al.* 1994). Este grupo está classificado dentro da família TS-like, pois seus membros não possuem atividade enzimática.

Os membros do grupo Tc-85 apresentam massa molecular semelhante e pontos isoelétricos (pI) diferentes, estão ancorados à membrana do parasita via GPI (glicosilfosfatidilinositol) e têm vida média de 3 a 4 horas (Alves 1996). O anticorpo monoclonal H1A10 (mAbH1A10) que reconhece e definiu essas glicoproteínas, inibe parcialmente a invasão (50-90%) do parasita em células *in vitro*, mas reconhece só parte da população de tripomastigotas de cultura (Alves, 1986). A primeira proteína clonada e estudada foi denominada Tc85-11 (Giordano *et al.* 1999). O domínio N-terminal da proteína recombinante Tc85-11, liga-se de maneira saturável e específica a laminina-1 (Giordano *et al.* 1999; Marroquin-Quelopana *et al.* 2004). A interação do *T. cruzi* com a laminina é aumentada pela galectina-3 (Vray *et al.* 2004) e deve estar relacionada com um dos membros da gp85/trans-sialidase.

A Tc85-11 apresenta o domínio FLY que se liga a um receptor caracterizado como citoqueratina 18 (CK18) presente na superfície de células LLC-MK<sub>2</sub> (célula epitelial de rim de macaco) (Magdesian *et al.* 2001). No mesmo trabalho Magdesian *et al.* (2001), demonstram que o peptídeo J (que contém o domínio FLY) se liga de forma saturável a células epiteliais LLC-MK<sub>2</sub> diferentemente dos peptídeos A e G, dois peptídeos utilizados como controles, também pertencentes à porção C-terminal.

Outros clones estudados em nosso laboratório foram a Tc85-12 e a Tc85-45. Ambas as proteínas recombinantes aderem a células LLC-MK<sub>2</sub> de maneira dose-dependente e a Tc85-45 inibe parcialmente a invasão do parasita na célula hospedeira (Signorini 2006), evidenciando a importância dessa família na invasão do

parasita. Vale notar que o clone Tc85-45 apresenta o motivo RGD, importante sítio de adesão de diversas moléculas à integrina (Pytela *et al.* 1995).

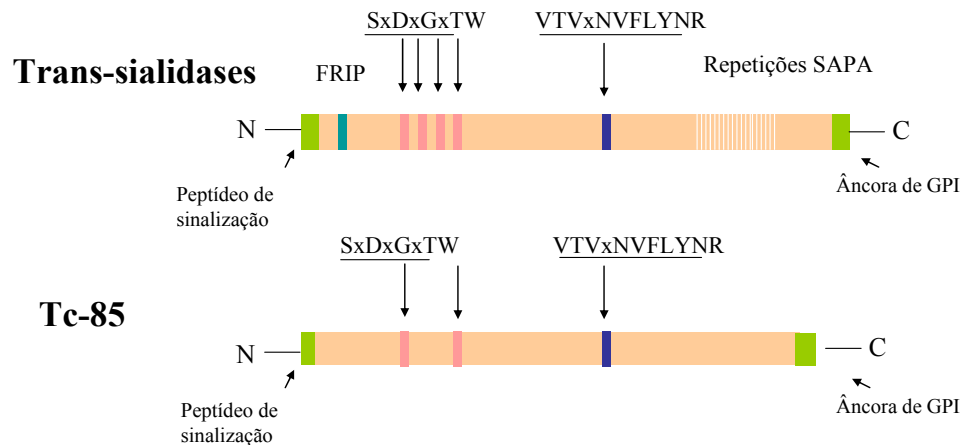


Figura 2: Comparação da estrutura geral da trans-sialidase ativa com a Tc85 de *T. cruzi*.

### 1.6 A Matriz Extracelular

*“A matriz extracelular (MEC) é uma rede intrincada de macromoléculas que ocupa o espaço extracelular nos tecidos. Variações na quantidade relativa das diferentes macromoléculas, assim como na sua organização, dão lugar a uma diversidade de formas de matriz extracelular, que se adaptam às exigências funcionais de cada tecido em particular. Assim, a matriz não é meramente uma estrutura que estabiliza a estrutura física dos tecidos, mas também tem papéis complexos, influenciando o desenvolvimento, migração, proliferação, forma, organização e função das células” (apud Turner et al. 1989).*

A MEC também está relacionada com a resposta inflamatória, cicatrização, homeostase de tecidos e órgãos e apresenta um papel central no desenvolvimento embrionário. Na composição da MEC estão presentes macromoléculas aniônicas hidrofílicas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos), glicoproteínas (laminina, fibronectina, colágeno), que apresentam características multiadesivas, e proteínas que não fazem parte da constituição da rede intrincada (como os fatores de crescimento) (Berrier & Yamada 2007). Essas macromoléculas interagem entre si formando uma estrutura tri-dimensional e estão ligadas à célula por receptores na superfície da membrana denominados integrinas. A Matriz extracelular pode ter uma função especializada como a lâmina basal.

A lâmina basal é encontrada na superfície basal de células epiteliais, endoteliais e envolvem músculos, células adiposas e nervosas periféricas. Com 20-100 nm de espessura, a lâmina basal, é essencial para a estabilidade do tecido e forma uma barreira entre os diferentes tipos de células. Além disso, controla a troca de macromoléculas com o tecido conjuntivo e está associada à regulação da diferenciação, proliferação e migração celular. A lâmina basal é composta por isoformas de colágeno tipo IV, proteoglicanos (perlecan) e glicoproteínas (laminina e entactina).

Parasitas e bactérias, para aderirem às células e as invadirem, apresentam a capacidade de atravessar a barreira de matriz extracelular. Muitos desses microorganismos expressam proteínas capazes de aderirem aos componentes de MEC desempenhando um papel importante na disseminação destas patogenicias (Hauck 2002). Em *Echinococcus granulosus* (Zhang *et al.* 1997) e *Mycobacterium tuberculosis* (Pethe *et al.* 2002) foram encontradas proteínas que se ligam a laminina. Já as lamininas presentes na superfície de células de Schwann têm as



suas cadeias  $\alpha 2$  envolvidas no processo de adesão de *Mycobacterium leprae* (Marques *et al.* 2001). A levedura *Paraccoccidioides brasiliensis* apresenta duas proteínas na superfície, de 47 e 80 KDa, que se ligam ao colágeno tipo I (Mendes-Giannini *et al.* 2006). A bactéria *Streptococcus gordonii* tem relevante ligação com fibronectina e os colágenos tipo I e II (Guomarelli *et al.* 2006). Já o *Mycoplasma fermentans*, ao se ligar ao plasminogênio e aos colágenos tipo I e IV, oferece maior aderência do micoplasma à célula hospedeira (Amaichai & Rottem 2007).

Na literatura há uma série de trabalhos relativos ao papel da matriz extracelular na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Na década de 80, Ouaiissi *et al.* (1984) demonstraram que a adição de fibronectina humana no meio de cultura de fibroblastos promove uma maior adesão de tripomastigotas por célula, resultando em aumento na porcentagem de células infectadas. A importância desta molécula na infecção por *T. cruzi*, foi confirmada pela adição de anticorpo anti-fibronectina plasmática humana ao ensaio de invasão de cultura de células por *T. cruzi* obtendo-se uma redução na interação parasita-célula (Ouaiissi *et al.* 1985). Demonstrou-se também a importância de uma glicoproteína de 80 KDa de tripomastigota na associação com a fibronectina e que a seqüência RGD estava envolvida nesta interação (Ouaiissi *et al.* 1986). Macrófagos incubados com fibronectina antes ou no decorrer do processo de invasão proporcionaram um aumento na associação com tripomastigotas (Wirth & Kierszenbaum 1994). Calvet *et al.* (2004) observaram, ainda, uma diminuição na porcentagem de células infectadas após tripomastigotas serem tratados com fibronectina.

O papel da fibronectina na infecção por *T. cruzi* pode ser explicado pela utilização da fibronectina solúvel como uma ponte que permite a associação do parasita com a célula hospedeira ou, adicionalmente, o parasita pode ligar-se

diretamente na fibronectina insolúvel encontrada na lâmina basal e na matriz extracelular (Ouaissi *et al.* 1988; Calvet *et al.* 2004).

Na literatura, a laminina mostra ter um papel importante na infecção do *Trypanosoma cruzi*. Anticorpos anti-laminina inibem parcialmente a invasão do tripomastigota na célula (62-75%) e, além disso, o domínio N-terminal da proteína recombinante Tc85-11, se liga de maneira saturável e específica a laminina-1 (Giordano *et al.* 1999; Marroquin-Quelopana *et al.* 2004). Um componente ácido do grupo Tc85, presente em tripomastigotas, foi descrito como ligante de laminina e denominado LBG (Laminin Binding Glycoprotein) (Giordano *et al.* 1994). Ulrich *et al.* (2002) mostraram que a infecção de células epiteliais por *T. cruzi* é inibida por aptâmeros que se ligam a receptores de laminina na superfície do parasita. Nde *et al.* (2006) observaram que bloqueando a transcrição de laminina-1 pela técnica de RNA de interferência há uma drástica redução de células infectadas por *T. cruzi*. Além disso, a interação de *T. cruzi* com a laminina é aumentada pela galectina-3 (Vray *et al.* 2004) reforçando, assim, a importância dessa molécula nos processos de adesão e interiorização do parasita na célula.

Outros componentes da matriz extracelular também apresentam papéis importantes na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Em 1991, Ortega-Barria & Pereira purificaram uma proteína de 60 KDa da forma tripomastigota do *T. cruzi*, que apresenta uma adesão seletiva para 3 componentes da MEC: heparina, heparan sulfato e colágeno. No mesmo trabalho, os autores demonstram que fibroblastos tratados com essa proteína inibe a invasão do parasita na célula. Essa proteína de 60 KDa foi denominada penetrina. Linhagens de células mutantes, derivadas de células de ovário de hamster chinês (CHO), deficientes em heparina ou heparan sulfato, são resistentes à invasão por tripomastigotas (Herrera *et al.* 1994). De

Oliveira Jr *et al.* (2008) purificaram duas proteínas, ambas encontradas nos extratos totais de tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, uma de 65 KDa e outra de 59 KDa, que se ligam a heparina, sendo a última detectada preferencialmente por Western blot. No mesmo trabalho, este grupo demonstra que cardiomiócitos tratados com heparina reduz a média do número de células infectadas. Uma outra proteína de 80 KDa liberada pelo parasita apresenta papel de colagenase sobre os colágenos tipo I e IV presentes na lamina basal do tecido epitelial (Santana *et al.* 1997). Já a trombospondina-1 quando silenciada com RNAi diminui a adesão e interiorização do parasita na célula (Simmons *et al.* 2006).

Neste trabalho, estudamos o papel de dois componentes da matriz extracelular na interação com componentes da membrana de *T. cruzi*, abaixo descritas:

### *Laminina*

Lamininas são as principais glicoproteínas da lâmina basal, heterotriméricas com cerca de 850 KDa de massa molecular. Até hoje foram caracterizadas 15 isoformas diferentes que participam no arranjo da matriz extracelular promovendo adesão, migração e crescimento celular (Hakamori *et al.* 1984; Sasaki *et al.* 2004). As isoformas de laminina são compostas por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Timpl *et al.* 1979), sendo conhecidas cinco tipos de cadeias  $\alpha$ , três de  $\beta$  e três de  $\gamma$  que se combinam entre si. Estas subunidades são criadas a partir de processos proteolíticos (exemplo: processo proteolítico no domínio G das cadeias  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ , que podem ter um papel importante na modulação e função de várias isoformas de laminina) e *splicing* alternativo (exemplo: mais de um RNA pode transcrever para a cadeia  $\alpha_1$  (Velling *et al.* 1999)). Os vários tipos de laminina são expressos em

tecidos específicos, podendo ser recrutadas para áreas especializadas na membrana basal, como em junções neuromusculares (Tuggal *et al.* 2000).

A clássica ligação da laminina à célula se dá via integrina, crucial no controle da diferenciação celular pela membrana basal (Kikkawa *et al.* 1998). Porém, existem receptores para laminina na superfície celular como o heparam sulfato e a distroglicana. Além disso, para que ocorram estabilidade e rigidez na lâmina basal, a laminina é fortemente associada a outras proteínas de adesão como a entactina ou nidogênio e também forma ligações cruzadas com o colágeno tipo IV.

A laminina-1 é a isoforma mais bem estudada. Foi purificada pela primeira vez a partir de tumor de murino EHS (Engelbreath-Holm-Swarm) (Timpl *et al.* 1979). Quando observada por microscopia eletrônica, sua estrutura se assemelha a uma cruz, com três braços curtos e um longo. Cada braço curto é formado pela região N-terminal de uma das três cadeias:  $\alpha 1$  (massa de aproximadamente 400 KDa),  $\beta 1$  e  $\gamma 1$  (massas de aproximadamente 200 KDa cada). O braço longo formado pelas regiões C-terminais das três cadeias associadas formam uma “haste”, que apresenta no seu término uma região globular denominada domínio G, sendo formado exclusivamente pela cadeia  $\alpha 1$  (Tunggal *et al.* 2000). Este domínio apresenta cinco sub-domínios *in tandem* denominados LG1-LG5, (Sasaki *et al.* 1988 Sasaki & Yamada 1987). Os domínios LGs contém o maior número de sítios reunidos de receptores celulares (Timpl *et al.* 2000).

Estas características são básicas para todas as isoformas de laminina, menos para as lamininas 5 e 9 que apresentam um truncamento dos braços curtos. No epitélio, os heterodímeros mais abundantes são: laminina-1, laminina-5 ( $\alpha 5\beta 3\gamma 2$ ) e a

laminina-10 ( $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ ), porém outras isoformas podem estar presentes em pequenas quantidades (Ekblom *et al.* 1998).

### *Fibronectina*

É uma glicoproteína que apresenta duas cadeias peptídicas de 230-270 KDa cada, ligadas por pontes dissulfeto, contém cerca de 5% de carboidratos e é codificada por um único gene. Está envolvida no processo de adesão, geralmente auxiliada por colágeno e proteoglicanos, em diferenciação e migração celular e rearranjos do citoesqueleto, participando até mesmo da cicatrização. Pode ser encontrada no plasma, na forma solúvel, sendo nesse caso sintetizada por hepatócitos. Na matriz extracelular é encontrada na forma insolúvel sendo sintetizada por fibroblastos, condrócitos, células endoteliais e algumas células epiteliais. Inicialmente a fibronectina é distribuída difusamente sobre a célula, e com o progresso de “montagem”, dímeros de fibronectina formam pequenas fibrilas que são, subseqüentemente, convertidas em densa rede fibrilar (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer 2003).

Cada cadeia do dímero de fibronectina contém três módulos de repetições: tipos I, II e III. Esses módulos compreendem domínios funcionais que medeiam à interação com outros componentes da MEC. A fibronectina consiste de 12 tipos de módulo I, dois tipos de módulo II e 17 tipos de módulo III, sendo dois obtidos por “*splicing*” alternativo (Hynes 1990; Schwarzbauer *et al.* 1987). Os módulos I e II são responsáveis pela ligação entre as duas cadeias por meio de pontes dissulfeto. Os módulos I<sub>1-5</sub>, encontrados na região N-terminal são os principais responsáveis pela interação fibronectina-fibronectina na MEC formando a rede fibrilar, mas outros módulos também auxiliam nesta interação (Mao & Schwarzbauer 2005).

A ligação da fibronectina à célula se dá através de um sítio de ligação RGD (Arg-Gly-Asp) encontrada no módulo III<sub>10</sub> que interage com receptores de membrana denominados integrinas, mais comumente à integrina  $\alpha 5\beta 1$ , conferindo coesão ao tecido. Uma região V (também chamada de IIICS) é importante para a secreção dos dímeros da fibronectina e promove a ligação com a integrina  $\alpha 4\beta 1$  (Guan & Hydes 1990).

As fibrilas de fibronectina são significativamente elásticas. O movimento das células deforma essas fibrilas podendo rompê-las e a perda do contato com a célula resulta em uma contração de até  $\frac{1}{4}$  da extensão original (Ohashi *et al.* 1999). Ohashi *et al.* (2002) demonstram que esta elasticidade é dependente da organização da actina no citoesqueleto. A rede formada pela fibronectina é relativamente estável e seu processo de *turnover* em cultura de fibroblastos é muito baixo (McKeown-Longo & Mosher, 1983). Além disso, a rede fibrilar da fibronectina é regulada por sinalização intracelular. A ligação com a integrina, a organização da actina no citoesqueleto, a contração celular e a ativação de quinases, todos contribuem para a montagem desta rede fibrilar (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar o papel de vesículas liberadas pelo parasita na expressão e deposição de componentes de matriz extracelular.

### **2.2 Objetivos específicos**

Estudar a expressão e deposição de laminina e fibronectina por células epiteliais tratadas com a proteína recombinante Tc85-45, peptídeo J, e as frações proteicas e lipídicas das vesículas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Preparação de bactérias competentes

Bactérias competentes foram preparadas segundo o método de Hanahan (1983). Um tubo de bactérias da cepa desejada foi descongelado no gelo por 15 minutos. As bactérias foram inoculadas em placas de LB (vide abaixo), suplementados com  $\text{MgSO}_4$  10 mM e incubadas a 37°C durante a noite. Uma colônia foi retirada e inoculada em 2 ml de meio LB pré-aquecido a 37°C e mantida por aproximadamente 2 horas a 37°C e 225 rpm até atingir  $\text{Abs}_{600\text{nm}} \approx 0,5$ . Este material foi transferido para 50 ml de meio LB pré-aquecido a 37°C e incubado por mais 2 horas a 37°C e 225 rpm até atingir  $\text{Abs}_{600\text{nm}} \approx 0,6$ . O frasco com a cultura de bactérias (tubo de centrifuga de 50 ml) foi colocado no gelo por 15 minutos e, após a adição de 0,5 ml de  $\text{MgCl}_2$  1M foi incubado por mais 15 minutos no gelo. A cultura foi centrifugada a 5.000 rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 10 ml de tampão RF I (vide abaixo) gelado e deixado em repouso por 15 minutos no gelo. Foi realizada outra centrifugação de 10 minutos a 5.000 rpm a 4°C e o precipitado foi ressuspendido em 2 ml tampão RF II (vide abaixo) gelado. As bactérias foram distribuídas em alíquotas de 50  $\mu\text{l}$ , em baixa temperatura, e armazenadas por até 2 meses a -80°C.

**Meio LB:** 1% de Bacto Triptona (Sigma), 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl.



**RF I:** KCl, 100 mM; MnCl<sub>2</sub>, 50 mM; acetato de potássio, 30 mM, pH 7,0; CaCl<sub>2</sub> 10mM; Glicerol, 15%. O pH do tampão foi ajustado para 5,8 com ácido acético e a solução foi esterilizada por filtração.

**RF II:** KCl, 75mM; CaCl<sub>2</sub>, 75mM; MOPS 10mM, pH 7,0; MgCl<sub>2</sub>, 10mM; Glicerol, 15%. O pH da solução foi ajustado para 6,8 com ácido acético e a solução foi esterilizada por filtração.

### **3.2 Mini-preparações de DNA plasmidial**

A cepa bacteriana DH5 $\alpha$  competente foi utilizada para a propagação e manutenção da proteína Tc85-45 recombinante. As bactérias contidas em um tubo foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 150  $\mu$ l de solução PI (vide abaixo). Em seguida, foram acrescentados 150  $\mu$ l de solução PII (vide abaixo) e o precipitado foi homogenizado e incubado por 2 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 150  $\mu$ l de solução PIII (vide abaixo), seguido de homogenização por 5 minutos no gelo. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos e o DNA extraído com 450  $\mu$ l de fenol:clorofórmio:isoamil-álcool (25:24:1). O material foi centrifugado na mesma velocidade por 1,5 min.

**PI:** Tris-HCl, 50mM, pH 8,0.

**PII:** NaOH, 200mM; SDS, 1%.

**PIII:** acetato de potássio, 2,55M, pH 4,8.

### 3.3 Purificação da proteína recombinante Tc85-45 por cromatografia de afinidade

Para a obtenção da proteína recombinante em grande escala, foram adicionados a bactérias competentes da cepa BL21(DE3), plasmídeos correspondentes à Tc85-45, sendo o vetor PCR T7/NT TOPO<sup>®</sup> Cloning (Invitrogen) utilizado para a expressão da proteína recombinante. Após incubação no gelo por 30 minutos, o material foi submetido a um choque térmico de 42°C por 30 segundos e resfriamento no gelo por 2 minutos. Em seguida adicionaram-se 250 µl de meio LB pré-aquecido a 37°C e o material foi incubado sob agitação (225 rpm) a 37°C. Após 1 hora, 10 µl do cultivo foram transferidos para o meio LB-Ágar contendo 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol seguido de incubação durante a noite a 37°C. Uma colônia foi coletada e ampliada em 50 ml de meio LB com 100 µg/ml de ampicilina e 34 µg/ml de cloranfenicol (nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente) durante a noite, sob agitação a 225 rpm a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se 1 litro de meio LB e cultivou-se até atingir  $Abs_{600nm} = 0,6$ . Após a adição de IPTG (1 mM concentração final), a cultura foi mantida sob agitação a 225 rpm por mais 4 horas e as células coletadas por centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 200 ml de tampão de lise (vide abaixo) contendo PMSF, 5 µM; TLCK, 1 µM e 0,2 mg/ml de lisozima. O material foi mantido sob agitação por 20 minutos à temperatura ambiente e submetido a ultra-som (5 pulsos de 15 minutos com intervalos de 1 minuto, por 10 vezes). Após uma nova centrifugação de 15 minutos a 10.000 rpm o precipitado foi ressuspenso em 100 ml de tampão A (vide abaixo), ficando sob agitação durante a noite a 4°C. Em seguida foi feita uma centrifugação de 25 minutos a 15.000 rpm e o sobrenadante foi adicionado à

coluna contendo a resina Chelating-Sepharose (Pharmacia) ativada com  $\text{Ni}^{2+}$  (0,5 ml/min). Após a absorção da amostra na resina foi feito um processo de *refolding* da proteína recombinante, lavando-se sucessivamente a coluna com 5 volumes das seguintes soluções: A; A:B (vide abaixo) (1:1 v/v); A:B (1:3 v/v); B. A proteína recombinante foi eluída com um tampão apropriado (tampão de eluição - vide abaixo) a 0,5 ml/min, coletando-se frações de 1 ml. O conteúdo protéico das frações foi dosado pelo método de Bradford e as frações contendo proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo SDS (SDS-PAGE).

**Tampão de lise:**  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM, pH 8,0; NaCl, 300 mM; imidazol, 5 mM.

**Tampão A:** uréia, 8 M; NaCl, 500 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0;  $\beta$ -mercaptoetanol, 5mM.

**Tampão B:** NaCl, 500 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0; imidazol, 40 mM.

**Tampão de eluição:** NaCl, 500 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0; imidazol, 300 mM.

### 3.4 Cultura de células

As células de epitélio de rim de macaco *Rhesus* (LLC-MK<sub>2</sub>) foram mantidas em meio DME contendo 1,2g/L de  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ,  $5 \times 10^3$  U/L de penicilina e 100mg/L de estreptomicina e suplementado com 10% de SFB. As garrafas foram mantidas a 37°C em estufa umidificada em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As sub-culturas foram realizadas a cada 7 dias a partir de monocamadas de células, as quais foram lavadas com PBS (fosfato, 10mM; NaCl, 150mM, pH 7,4) e tratadas com 0,1% tripsina em PBS contendo de EDTA, 1mM. As culturas foram iniciadas com aproximadamente  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em garrafas Falcon de 75 cm<sup>2</sup> de área.

### **3.5 Separação das frações solúvel e insolúvel de cultivos de células LLC-MK<sub>2</sub>**

Para verificar a deposição de elementos de matriz extracelular, as culturas de células foram separadas nas frações solúvel e insolúvel, como descrito em Cella *et al.* (2006), sendo que a matriz depositada encontra-se na fração insolúvel.

Foram cultivadas  $1 \times 10^5$  células LLC-MK<sub>2</sub>, como descrito acima. Após os períodos de incubação com o material de interesse, as células foram lavadas 2 vezes com tampão para estabilizar os microtúbulos (tampão A) e a fração solúvel foi coletada mantendo-se as culturas no gelo por 5 minutos com o tampão apropriado, descrito abaixo. A fração insolúvel foi obtida mantendo-se as culturas a 4°C por 20 minutos com tampão RIPA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm e coletados os sobrenadantes.

**Tampão A:** Pipes, 100 mM, pH 6.9; Glicerol, 2 M; EGTA, 1 mM; acetato de magnésio, 1 mM.

**Tampão para extração das frações solúveis:** de Triton X-100, 0,2%; ortovanadato de sódio, 1 mM ; PMSF, 1 mM; aprotinina, 5µg/ml; leupeptina, 5µg/ml.

**Tampão para extração das frações insolúveis (Tampão RIPA):** Tris, 50 mM, pH 7.4; NaCl, 150 mM; Triton X-100, 0,1%; SDS, 0,1%; desoxicolato de sódio, 0,5%; PMSF, 1mM; aprotinina, 5µg/ml; leupeptina, 5µg/ml.

### 3.6 Contagem de células em divisão

No intuito de verificar se as moléculas estudadas influenciam a divisão celular,  $1 \times 10^5$  células LLC-MK<sub>2</sub> foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas e incubadas com 150 µg de Tc85-45, 150 µg de vesículas, 10 µg de peptídeo J, 10 µg de peptídeo A (controle) ou PBS (PBS), por 24 horas a 37°C. As células foram fixadas com metanol por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas 2 vezes com PBS e após a adição de 1 ml de PBS/Hoeschst (1:1000) foram incubadas por mais 30 min. As lâminas foram montadas e contadas 500 células em 20 campos e, destas, as células que se apresentavam em processo de mitose. Foram feitas as razões de número de células em mitose/número total de células. O experimento foi feito em triplicata.

### 3.7 Imunocitoquímica

A expressão de matriz extracelular foi acompanhada como descrita por Pinho *et al.* (2002), com algumas modificações. Células LLC-MK<sub>2</sub> ( $1 \times 10^4$ ) foram cultivadas por poço com lamínulas de vidro em placas de 24 poços, como descrito no item 3.4. As células foram incubadas com o material de interesse por 24 horas a 37°C. Após 3 lavagens com PBS, as células foram fixadas com metanol por 3 minutos, lavadas com PBS e a peroxidase endógena foi bloqueada com 4,5% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em PBS, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após bloqueio com 1% de BSA em PBS por 15 minutos, foram feitas as incubações com os anticorpos: policlonal anti-laminina (1:1000) ou policlonal anti-fibronectina (1:1000), ambos diluídos em 1% BSA em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Os poços foram lavados com PBS e as células incubadas

com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente. Para controle, também foram analisadas células incubadas apenas com o anticorpo primário ou somente com o anticorpo secundário. A reação foi desenvolvida com Stable DAB (Invitrogen). Foram fotografados 30 campos e contadas 700 células e, destas, as células marcadas com DAB.

### **3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

O método utilizado de eletroforese vertical de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é o descrito por Laemmli, (1970). A separação foi feita em gel na concentração de 12,5% ou 6% de poliacrilamida. As aliquotas analisadas foram coletadas e solubilizadas em 50 µl de tampão de amostra (vide abaixo), aquecidas a 100°C por cinco minutos e aplicadas nas canaletas do gel de empilhamento. A eletroforese correu com voltagem constante de 120 V até que o corante azul de acompanhamento (azul de bromofenol) atingisse a borda inferior do gel. Em seguida o gel foi corado com uma solução de 0,2% de azul de Coomassie em metanol/ácido acético/água (45:10:45 v/v), por 30 minutos e em seguida descorado com ácido acético a 7%. Alternativamente, após separação das amostras por SDS-PAGE, o material foi submetido a Western blot. O padrão de massa molecular usado foi o Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range ou High Range.

**Tampão de amostra:** Tris-Base, 0,5mM, pH 6,8; glicerol, 38%; EDTA, 200mM; SDS, 20%; β-mercaptoetanol, 4%; e azul de bromofenol.

### 3.9 Western blot

Após a separação das amostras por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose por 1 hora, em amperagem constante de 50 mA, em um processo semi-seco, na presença do tampão de transferência (vide abaixo). As membranas foram coradas com uma solução de 0,2% de Ponceau. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com TBS-TT (vide abaixo), bloqueadas por 1 hora com 5% de leite desnatado em TBS-TT, e foram incubadas com os anticorpos de interesse por cerca de 1 hora à temperatura ambiente ou por 18 horas a 4°C. Após 3 lavagens com TBS-TT, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase em TBS-TT por mais 1 hora, lavadas e a marcação revelada por quimioluminescência com o Kit ECL (Amersham). As membranas foram reutilizadas após serem tratadas com tampão adequado (Tampão A) por 30 minutos a 60°C.

**Tampão de transferência:** glicina, 130 mM; Tris, 25 mM; etanol, 20%.

**Tampão TBS-TT:** Tris, 50 mM, pH 8.6; NaCl, 150 mM; Tween-20, 0,3%; Triton X-100, 0,5%.

**Tampão A:**  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM; SDS, 2%; Tris-HCl, 62,5 mM, pH 6.7.

### 3.10 Padronização das figuras de Western blot

Para padronização do gel foram aplicadas nas amostras 0,5  $\mu$ g de imunoglobulina de coelho. Em seguida, as concentrações de proteínas foram dosadas pelo método de Bradford e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. A padronização é feita a partir da razão entre as áreas da proteína

de interesse e da imunoglobulina obtidas pelo programa Image J utilizando exposições adequadas do filme de raios-X. Os valores destas razões são relacionados ao longo dos resultados. Algumas fotos de Western blot apresentados correspondem a filmes super-expostos para melhor visualização das bandas das proteínas.

### **3.11 Obtenção de vesículas liberadas pelo parasita *Trypanosoma cruzi***

As vesículas liberadas (shedding) no meio de cultura por formas tripomastigotas foram obtidas de acordo com o procedimento de Gonçalves *et al.* (1991). Os parasitas coletados, do sexto ao oitavo dia após infecção das células LLC-MK<sub>2</sub> *in vitro*, foram centrifugados a 7500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado, contendo os parasitas, foi ressuspenso em meio de cultura com 5% de SFB na proporção de 1 ml para cada 10<sup>9</sup> parasitas). Após a incubação de 2 a 3 horas a 37°C em estufa umidificada, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, os parasitas foram submetidos a nova centrifugação a 3.000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e mantido a 4°C até , Cerca de 99% dos tripomastigotas se apresentam viáveis e com mobilidade após esse procedimento. Medidos (Torecilhas *et al.* 2008). sua utilização.

### **3.12 Extração de glicolípídeo**

As vesículas, parasitas ou meio de cultivo foram liofilizados e os glicolípídeos foram extraídos sequencialmente com 500 µl de clorofórmio: metanol (C:M) 2:1



(v/v), 500 µl C:M 1:1 (v/v), 500 µl C:M 1:2 (v/v), sob agitação por 1 minuto à temperatura ambiente. As fases orgânicas foram separadas após centrifugação (5.000 rpm, por 10 minutos). Para cada solvente, o processo de extração foi realizado 3 vezes. As três fases de C:M foram reunidas e secas em evaporador rotatório. A fração C:M é composta principalmente por lipídeos neutros e fosfolipídeos. O precipitado foi, então, extraído 3 vezes com 500 µl de Clorofórmio:Metanol:Água (C:M:H<sub>2</sub>O) 1:2:0,8 (v/v/v), sob agitação por 1 minuto. Os extratos de C:M:H<sub>2</sub>O foram separados por centrifugação (5.000 rpm) por 10 minutos, reunidos e secos em evaporador rotatório. A fração C:M:H<sub>2</sub>O é composta principalmente de glicolipídeos. As quantidades das frações C:M:H<sub>2</sub>O e C:M utilizadas nos experimentos foram calculadas a partir do equivalente de parasita utilizados na obtenção de 150 µg de vesículas, que corresponde aproximadamente a  $1 \times 10^8$  parasitas.

### **3.13 Peptídeos sintéticos e mucinas**

Os peptídeos sintéticos A (IMRLSYTADNKWETM) e J (GKKPSVTVTNVFLYNRPLN) foram sintetizados pela Dra. Maria Aparecida Juliano da UNIFESP.

As mucinas utilizadas durante os estudos foram obtidas pela Dra. Ana Claudia Troccoli Torecilhas.

## 4. RESULTADOS

A primeira etapa do trabalho foi purificar a proteína recombinante Tc85-45. Em seguida, começamos a estudar os efeitos da Tc85-45, do peptídeo J e das vesículas na expressão de componentes de matriz extracelular, através de imunocitoquímica e Western blot.

### 4.1 Obtenção da proteína Tc-85

Para a realização dos experimentos foi escolhido o clone 45 da família Tc-85 (De Oliveira, R., 2000). A proteína recombinante foi purificada a partir do corpúsculo de inclusão, obtendo-se cerca de 1,5 mg de proteína recombinante a partir de um litro de cultura de bactérias transformadas e induzidas com IPTG por 4 horas. As etapas de indução e purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) após coloração com Coomassie blue. Como pode ser verificado, a proteína Tc85-45 apresentou massa molecular de aproximadamente 53 kDa (Figura 3).

Após a diálise em Tris-Base 0,5% em H<sub>2</sub>O MiliQ por 16 horas, trocando-se a solução uma vez, a proteína foi cromatografada em uma coluna Detoxi-Gel (Pierce) para a retirada de fosfolipídios de membrana das bactérias. A Tc-85 foi armazenada a -20°C até a sua utilização.

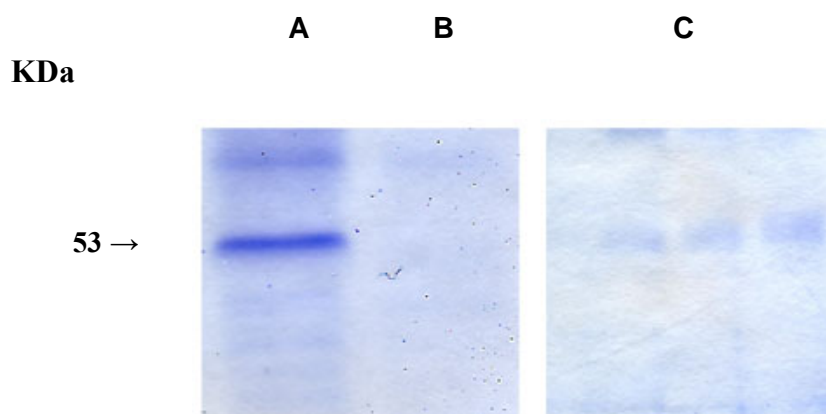


Figura 3: Análise da expressão e purificação da Tc85-45. O material foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% e corado com Coomassie blue 0,3% . A – Bactérias induzidas com IPTG; B – Bactérias não induzidas; C – Tc85-45 purificada, mostrando-se tubos que continham a proteína após a eluição.

## 4.2 Efeito de vesículas, Tc85-45 e peptídeo J na expressão de Matriz Extracelular

### 4.2.1 Por Imunocitoquímica

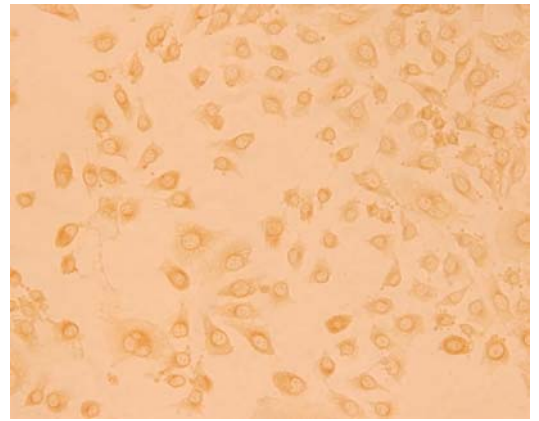
Para este ensaio, as células foram incubadas, respectivamente, com 150  $\mu$ g de Tc85-45, 150  $\mu$ g de vesículas ou 10  $\mu$ g de peptídeo J. Como controles do experimento foram utilizados PBS, 10  $\mu$ g de peptídeo A ou 150  $\mu$ g de DpfC. Este último é o domínio recombinante DpfC da proteína HpT, Histidina fosfotransferase, de *Xanthomonas axonopodis pv.atri*, que contém uma seqüência de histidinas e é purificada de maneira semelhante à Tc85-45. Após incubação e fixação, as células

foram incubadas com anticorpos anti-fibronectina ou anti-laminina. Através da técnica de imunocitoquímica, verificamos alterações significativas na expressão aparente de fibronectina (Figura 4) e laminina (Figura 5) em células LLC-MK<sub>2</sub> incubadas com vesículas e, em menor escala, com Tc85-45 para laminina, quando comparadas aos controles, PBS e DpfC. Células incubadas com o peptídeo J não apresentaram alterações quando comparadas aos controles.

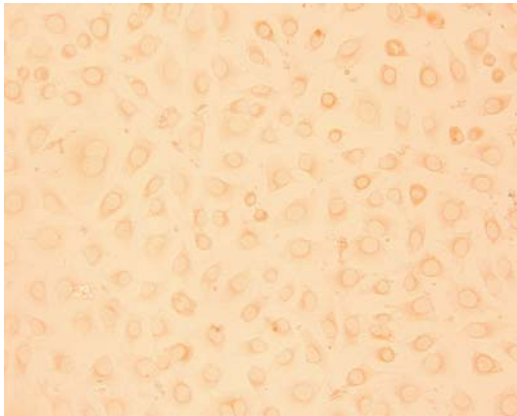
Para quantificar estas alterações, foram contadas 700 células em 30 campos e calculada a porcentagem de células marcadas por DAB (tabela 1). A porcentagem de células marcadas tanto para fibronectina quanto para laminina é maior para células incubadas com vesículas.



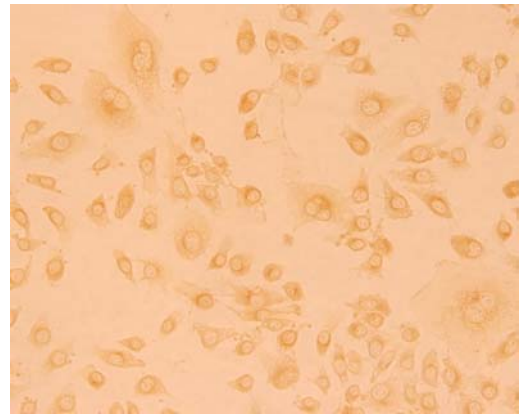
PBS



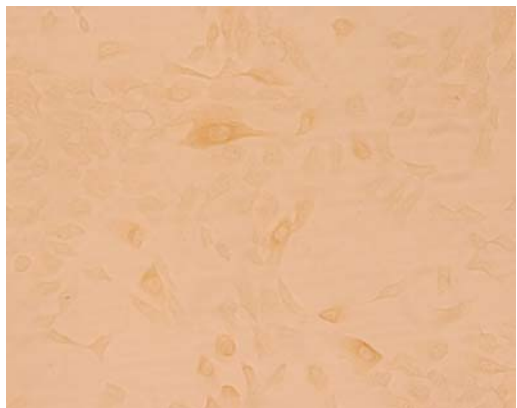
Vesículas



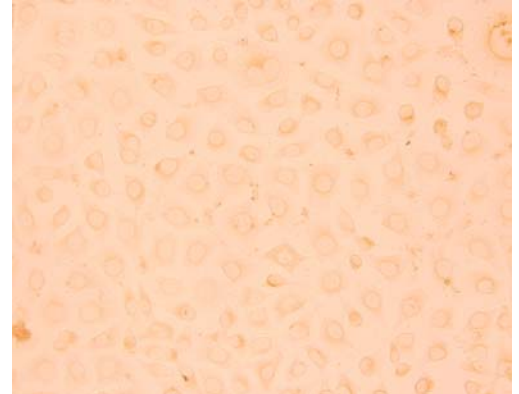
Peptídeo A



Tc85-45

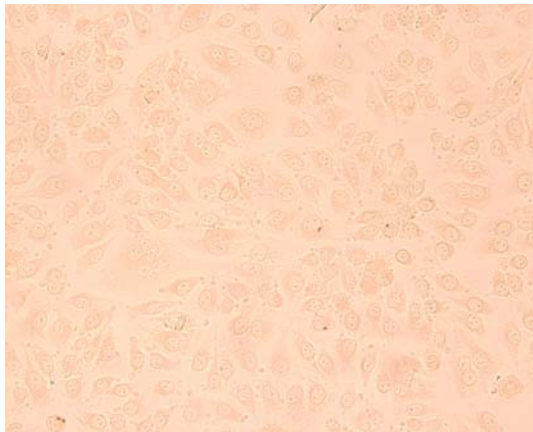


DpfC

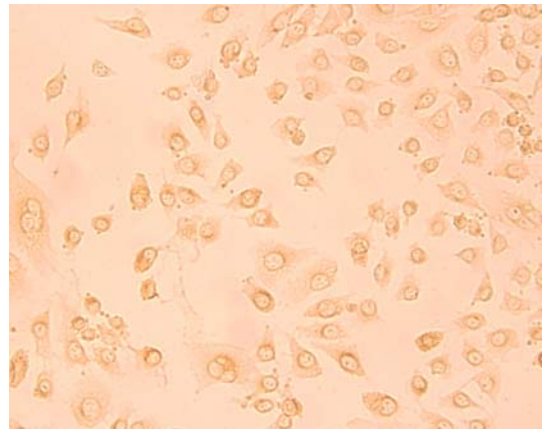


Peptídeo J

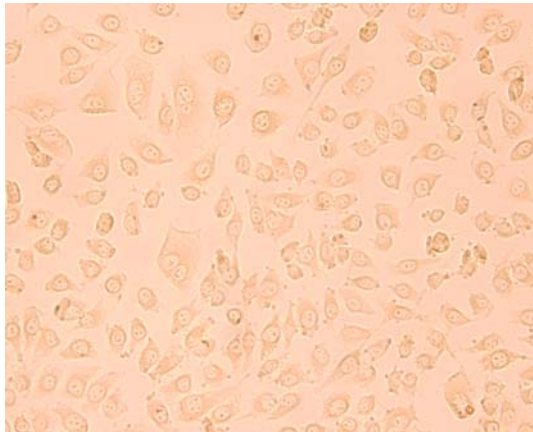
Figura 4: Deposição de fibronectina de células LLCMK<sub>2</sub> incubadas 24 horas com PBS; 150 µg de vesículas; 10 µg de peptídeo A; 150 µg de Tc85-45; 150 µg de DpfC; e 10 µg de peptídeo J. Revelação com anticorpo anti-fibronectina. Aumento de 40 vezes.



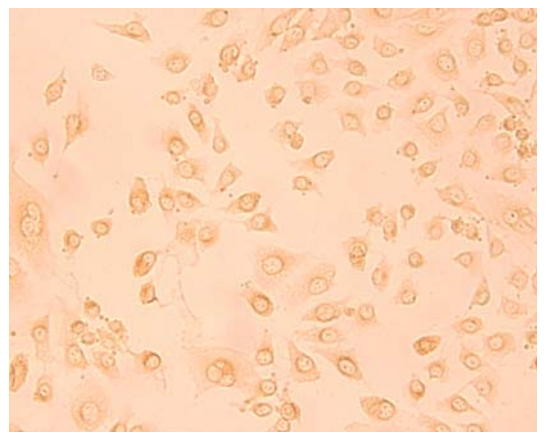
PBS



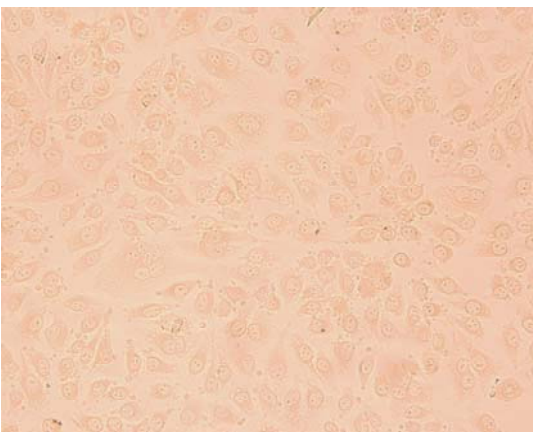
Vesículas



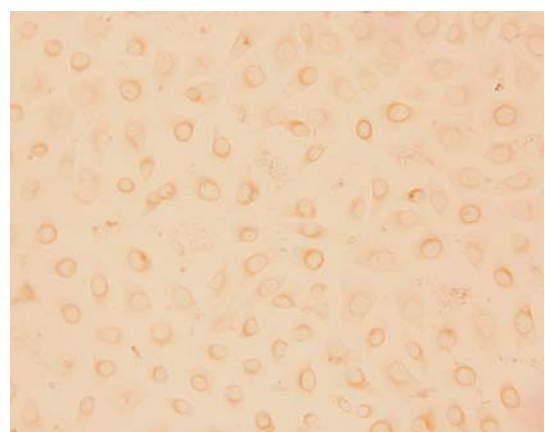
Peptídeo A



TC85-45



DpfC



Peptídeo J

Figura 5: Deposição de laminina de células LLCMK<sub>2</sub> incubadas 24 horas com PBS; 150 µg de vesículas; 10 µg de peptídeo A; 150 µg de Tc85-45; 150 µg de DpfC; e 10 µg de peptídeo J. Revelação com anticorpo anti-laminina. Aumento de 40 vezes.

Tabela 1. Porcentagem de células epiteliais marcadas na imunocitoquímica. Contagem de 700 células em 30 campos. Controles: PBS, peptídeo A e DpfC.

Anticorpo	Incubação	Células marcadas (%)
$\alpha$ -Fibronectina	PBS	21 $\pm$ 6,5
	DpfC (150 $\mu$ g)	20 $\pm$ 4,8
	Vesícula (150 $\mu$ g)	48,6 $\pm$ 3,1
	Tc-85 (150 $\mu$ g)	30 $\pm$ 4,0
	Peptídeo J (10 $\mu$ g)	26 $\pm$ 6
	Peptídeo A (10 $\mu$ g)	20 $\pm$ 4,9
$\alpha$ -Laminina	PBS	15 $\pm$ 2,0
	DpfC (150 $\mu$ g)	19 $\pm$ 2,2
	Vesícula (150 $\mu$ g)	44,7 $\pm$ 2,6
	Tc-85 (150 $\mu$ g)	29,5 $\pm$ 3,0
	Peptídeo J (10 $\mu$ g)	23,4 $\pm$ 5,4
	Peptídeo A (10 $\mu$ g)	18 $\pm$ 5,2

#### 4.2.2 Por Western blot – fração total

Após os testes com imunocitoquímica, fomos verificar a expressão de fibronectina e laminina através da técnica de Western blot.

Células LLC-MK<sub>2</sub> (1x10<sup>5</sup> por poço) foram cultivadas em placas de cultivo e incubadas com 150  $\mu$ g de Tc85-45, 150  $\mu$ g de vesículas ou 10  $\mu$ g de peptídeo J e para controle 10  $\mu$ g de peptídeo A, 150  $\mu$ g de DpfC ou PBS. Após 24 horas, os cultivos celulares foram incubados por 20 minutos com o tampão RIPA, descrito em material e métodos, sendo coletados os extratos totais destes cultivos (material

intracelular e extracelular). As frações foram dosadas e 20  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra foram analisadas pela técnica de Western blot.

Nos extratos totais não foram verificadas diferenças significativas de expressão de laminina (figura 6) ou de fibronectina (figura 7) para células incubadas previamente com Tc85-45 e peptídeo J. Porém, para células incubadas com vesículas, verificamos um aumento de fibronectina (figura 7) quando comparadas ao controle, mas não para laminina.

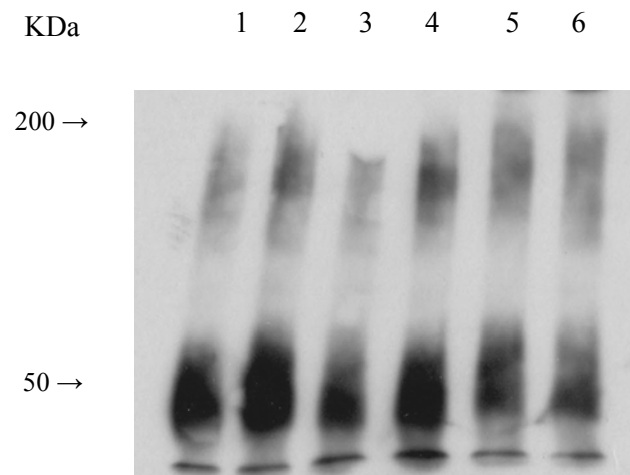


Figura 6: Análise da presença de laminina na extração total do cultivo celular: 1 – PBS (0,4); 2 – Tc85-45 (0,7); 3 – DpfC (0,3); 4 – vesículas (0,6); 5 – peptídeo J (0,7); 6 – peptídeo A (0,7). Revelado com anticorpo anti-laminina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras.



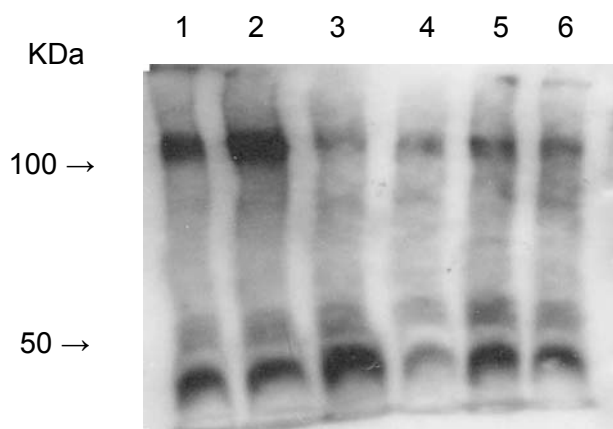


Figura 7: Análise da presença de fibronectina na extração total do cultivo celular: 1 – PBS (0,9); 2 – vesículas (1,9); 3-peptídeo A (0,4); 4 –peptídeo J (0,6); 5 – Tc85-45 (0,7); 6 – DpfC (0,7). Revelado com anticorpo anti-fibronectina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras.

#### 4.2.3 Por Western blot – frações solúvel e insolúvel dos cultivos celulares

Como há um aumento de reatividade de fibronectina, observada tanto pela técnica de imunocitoquímica, quanto pelos ensaios de Western blot, fomos verificar se esta variação se refletiria no aumento de fibronectina da matriz extracelular. Para tanto,  $1 \times 10^5$  células LLC-MK<sub>2</sub> foram submetidas à incubação, como descrito no ensaio anterior, e separadas as frações solúvel e insolúvel dos cultivos celulares. A fração insolúvel corresponde à matriz extracelular e, portanto, do material depositado pela célula.

Verificamos que há um aumento de reatividade com o anticorpo anti-fibronectina para as células tratadas com vesículas tanto na fração solúvel quanto na insolúvel (figura 8 e 9). Para os demais ensaios – Tc85-45, peptídeo J – e nos

controles, não verificamos um aumento de reatividade de anticorpo anti-fibronectina, confirmando os resultados anteriores.

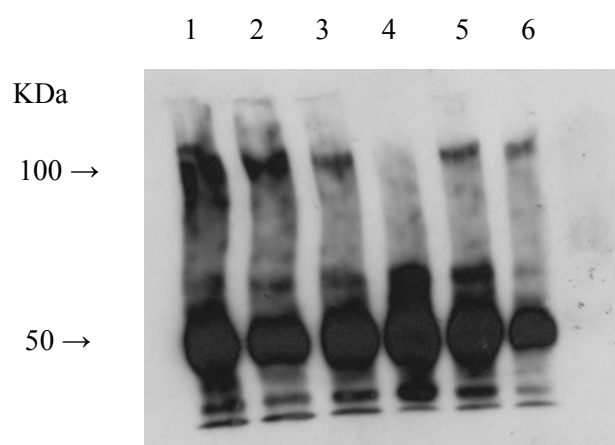


Figura 8: Análise da presença de fibronectina na fração insolúvel do cultivo de célula: 1 – vesícula (1,7); 2 – Tc85-45 (1,0); 3- DpfC (0,4) ; 4 –peptídeo J (0,7); 5 – peptídeo A (0,9); 6 – PBS (0,7). Revelado com anticorpo anti-fibronectina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras.

Também realizamos os mesmos experimentos para verificar a expressão de laminina. Na fração insolúvel não encontramos diferenças na deposição de laminina em nenhum dos ensaios (figura 10) e na fração solúvel dos cultivos celulares não conseguimos detectar laminina. A partir destes resultados, nosso trabalho passou a se concentrar na verificação da presença de fibronectina nos cultivos celulares.

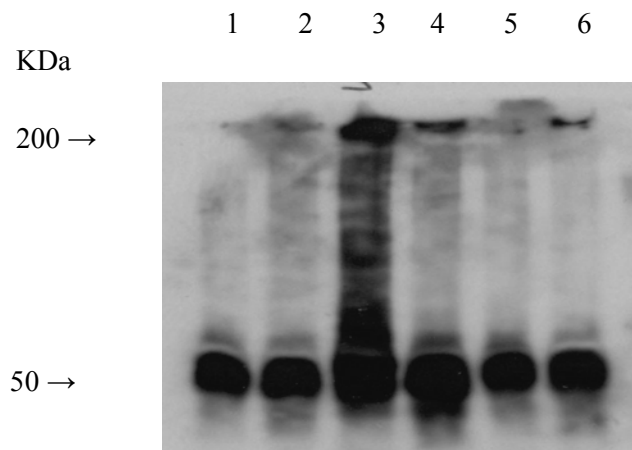


Figura 9: Análise da presença de fibronectina na fração solúvel do cultivo celular: 1 – peptídeo J (0,2); 2 – peptídeo A (0,3); 3 - vesícula (1,8); 4 – DpfC (0,6); 5– Tc85-45 (0,3); 6 – PBS (0,4). Revelado com anticorpo anti-fibronectina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras.

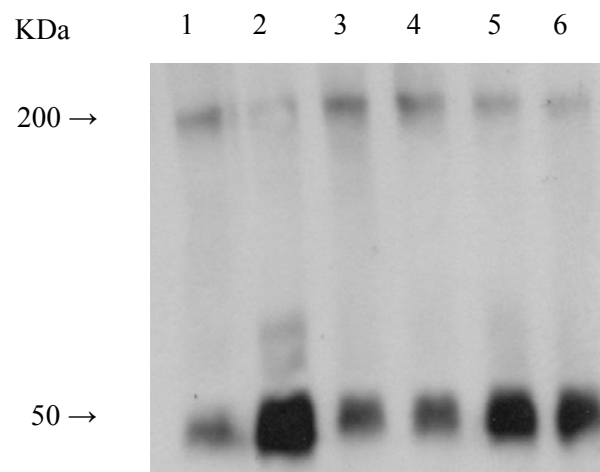


Figura 10: Análise da presença de laminina na fração insolúvel da cultura de célula: 1 – PBS (1,0); 2 – Tc85-45 (0,6); 3- vesícula (1,0); 4 – DpfC (0,8); 5– peptídeo J (0,8); 6 – peptídeo A (0,6). Revelado com anticorpo anti-laminina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras.

### 4.3 Vesículas, TC85-45 e peptídeo J não induzem a divisão celular

Para verificar se o aumento de reatividade do anticorpo anti-fibronectina com o DAB não é causado por um aumento de divisão celular, células LLC-MK<sub>2</sub> foram cultivadas e tratadas com 150 µg de Tc85-45, 150 µg de vesículas ou 10 µg de peptídeo J e, para controle, 10 µg de peptídeo A, 150 µg de DpfC ou PBS e após 24 e 48 foram coradas com Hoescht como descrito em material e métodos. Foram contadas 700 células em aproximadamente 30 campos e destas, contadas as células em divisão celular e calculadas as porcentagens (tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de células epiteliais em divisão, submetidas as diferentes pré-tratamentos. Fora contadas 700 células em aproximadamente 30 campos após coloração por Hoescht.

Incubação	% de células em divisão (24horas)	% de células em divisão (48horas)
Vesículas (150 µg)	2,2 ± 1,3	1,3 ± 0,7
Tc85-45 (150 µg)	2,9 ± 1,0	0,9 ± 0,7
Peptídeo J (10 µg)	2,5 ± 1,5	0,5 ± 0,6
Peptídeo A (10 µg)	2,1 ± 1,4	0,8 ± 0,4
DpfC (150 µg)	2,7 ± 1,4	1,1 ± 0,5
PBS	1,8 ± 1,2	0,4 ± 0,7

Tanto para as células incubadas por 24 horas quanto para as células incubadas por 48 horas não houve um aumento na quantidade de células em divisão celular na presença de vesícula, Tc85-45 e peptídeo J quando comparados aos

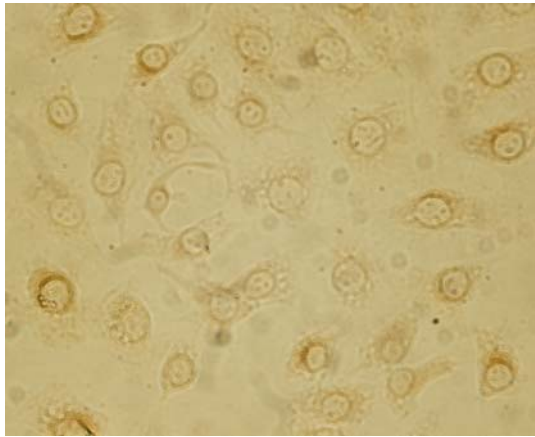
controles. O aumento de fibronectina não está relacionado, aparentemente, com um possível aumento de células em divisão.

#### **4.4 Efeito dos componentes da vesícula na expressão de fibronectina.**

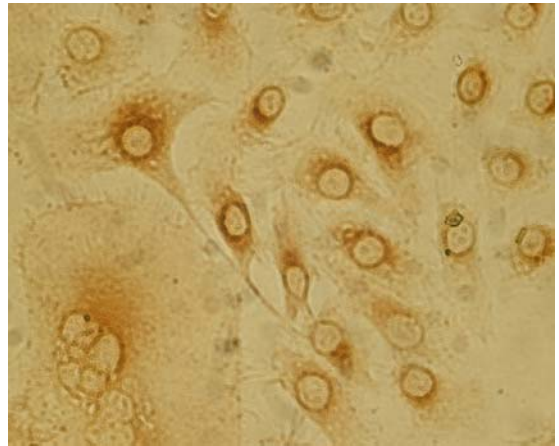
##### *4.4.1 Por imunocitoquímica*

Após verificar que há um aumento de deposição de fibronectina nas culturas de células tratadas com vesículas, fomos averiguar qual das frações, protéica ou lipídica, seria responsável por este aumento de reatividade. Para tanto a expressão de fibronectina foi verificada após a incubação com duas proteínas abundantes das vesículas e do parasita (Tc-85 e mucinas) e com as frações lipídicas extraídas das vesículas: uma mistura de clorofórmio e metanol (C:M) e de clorofórmio, metanol e água (C:M:H<sub>2</sub>O), extraídas como descrito em Material e Métodos. Utilizamos como controle do experimento 150 µg vesícula total, PBS e a fração de C:M:H<sub>2</sub>O obtida de cultura de tripomastigota. É importante lembrar que a quantidade de lipídios utilizados corresponde a 150 µg vesícula, cerca de  $1 \times 10^8$  parasitas.

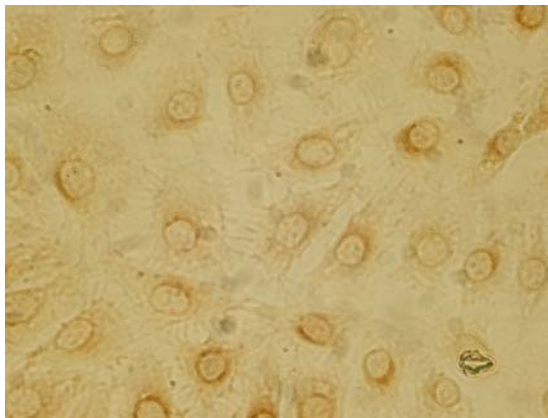
Por imunocitoquímica verificamos que a reatividade do anticorpo com a fibronectina foi similar ao controle de PBS quando as culturas celulares foram incubadas com Tc85-45, mucina (figura 11) e a fração lipídica da vesícula extraída com C:M (figura 12). Já quando as células foram incubadas com a fração C:M:H<sub>2</sub>O tanto da extração de vesícula, como de tripomastigotas, há um aumento evidente de reatividade com o anticorpo anti-fibronectina (figura 12). Para confirmar os dados foram contadas 700 células e calculada a porcentagem de células reativas (tabela 3).



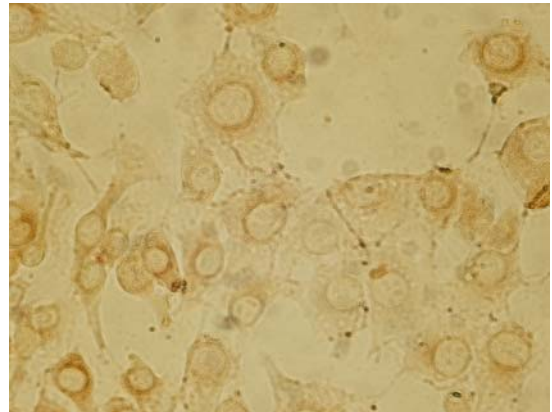
PBS



Vesícula total

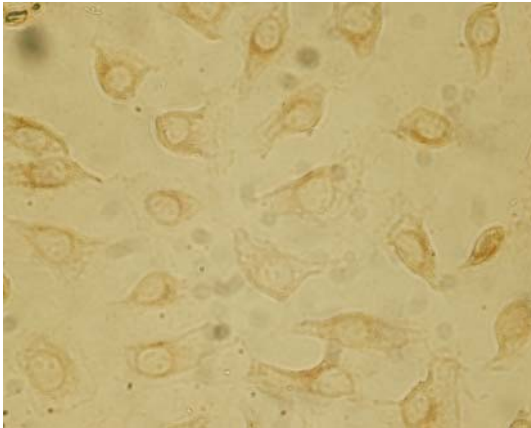


Tc85-45

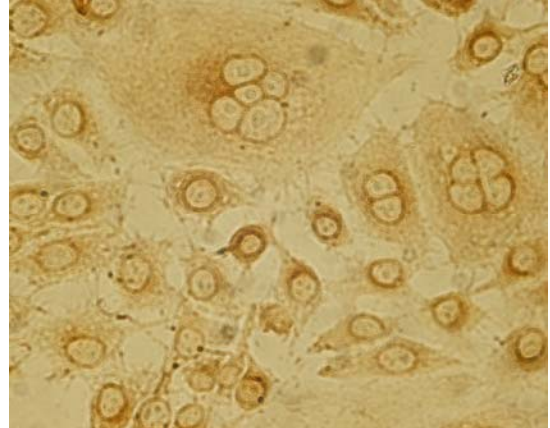


Mucina

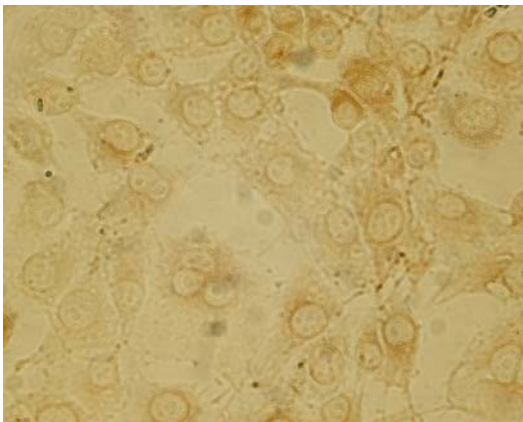
Figura 11: Deposição de fibronectina em células LL-CMK<sub>2</sub> incubadas 24 horas com PBS, 150 µg de vesículas, 150 µg de Tc85-45 ou 150 µg de mucina e reveladas com anticorpo anti-fibronectina. Aumento de 60 vezes.



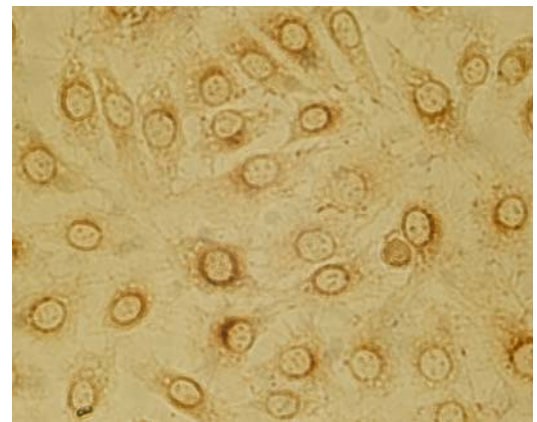
C:M:H<sub>2</sub>O (1:2:0,8) de meio de cultura



C:M:H<sub>2</sub>O (1:2:0,8) de vesícula



C:M de vesícula



C:M:H<sub>2</sub>O (1:2:0,8) de tripomastigota

Figura 12: Deposição de fibronectina em células LLC-MK<sub>2</sub> incubadas 24 horas com C:M:H<sub>2</sub>O de meio de cultura, C:M:H<sub>2</sub>O de vesícula, C:M de vesícula ou C:M:H<sub>2</sub>O de tripomastigota e reveladas com anticorpo anti-fibronectina. Aumento de 60 vezes.

Tabela 3. Reatividade de células LLC-MK<sub>2</sub> com anticorpo anti-fibronectina após diferentes tratamentos. Contagem de 700 células em 30 campos

Anticorpo	Incubação	% de células marcadas
	PBS	18 ± 3,7
	C:M:H <sub>2</sub> O de vesícula	51 ± 6,4
α-Fibronectina	C:M:H <sub>2</sub> O de tripomastigota	40 ± 5,5
	C:M de vesícula	20 ± 5,3
	Mucina (150 µg)	24,4 ± 5,8
	TC85-45 (150 µg)	28,4 ± 6,0
	Vesícula total (150 µg)	42,3 ± 4,9

#### 4.4.2 Por Western Blot – frações solúvel e insolúvel

Para confirmar os dados obtidos na imunocitoquímica utilizamos a técnica de Western blot. Neste caso, acrescentamos como controle as frações de clorofórmio:metanol (C:M) e clorofórmio:metanol:H<sub>2</sub>O (C:M:H<sub>2</sub>O) obtidas do meio de cultura utilizado na obtenção das vesículas (DME contendo 5% de soro fetal bovino).

O ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas acima (Tabela 3) e após as incubações, tanto a fração solúvel, como a insolúvel (material extracelular) foram extraídas e a presença de fibronectina verificada.

Quando analisamos a fração insolúvel das culturas de células tratadas com C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas e de tripomastigota, verificamos que há um aumento



significativo na deposição de fibronectina quando comparado com os controles (figura 13 e 14). As incubações realizadas com a Tc85-45 e a mucina não apresentaram alterações significativas quando comparadas aos controles.

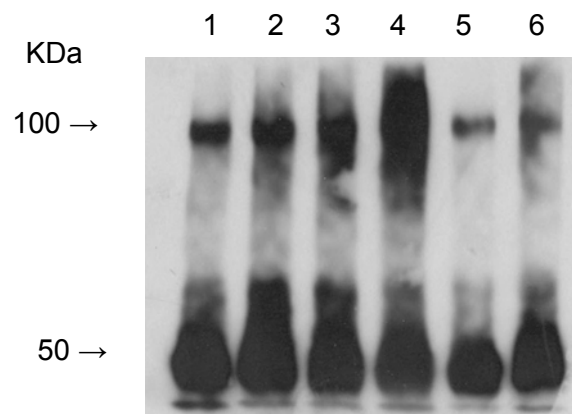


Figura 13: Análise da expressão de fibronectina na fração insolúvel do cultivo celular: 1 – PBS (1,0); 2 – extrato de C:M:H<sub>2</sub>O de tripomastigota (1,5); 3- vesícula total (2,6); 4 – extrato de C:M:H<sub>2</sub>O de vesícula (5,3); 5–Tc85-45 (1,2); 6 – mucina (1,2). Revelado com anticorpo anti-fibronectina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras. Nota: A revelação de Western blot utilizada para o cálculo da relação fibronectina/IgG não é a apresentada na figura).

Para a fração solúvel dos cultivos celulares foi detectado aumento da expressão de fibronectina para todos os compostos experimentados quando comparados com o PBS, porém não há diferença da expressão entre eles (Figura 15).

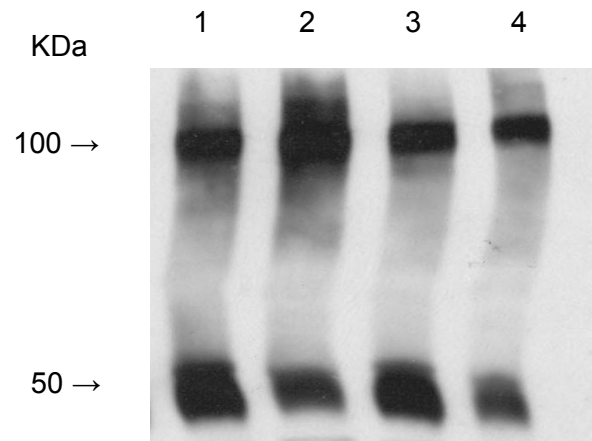


Figura 14: Análise da presença de fibronectina na fração insolúvel do cultivo celular: 1 – PBS (0,7); 2 – vesícula total (2,4); 3- extrato de C:M de meio de cultura DME (0,6); 4 – extrato de C:M:H<sub>2</sub>O de meio de cultura DME (0,5). Revelado com anticorpo anti-fibronectina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras. Nota: Para o cálculo da relação fibronectina/IgG o gel foi menos exposto a fim de evitar saturação de cor.

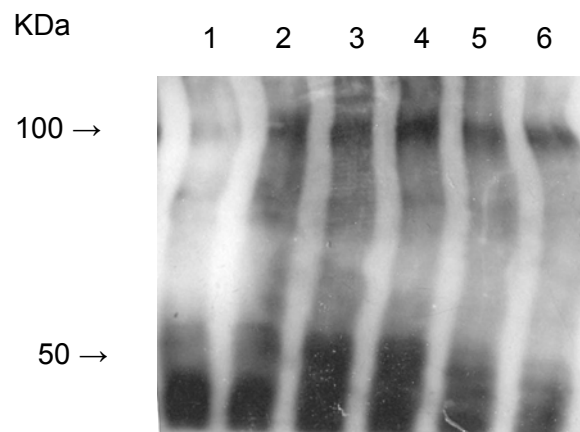
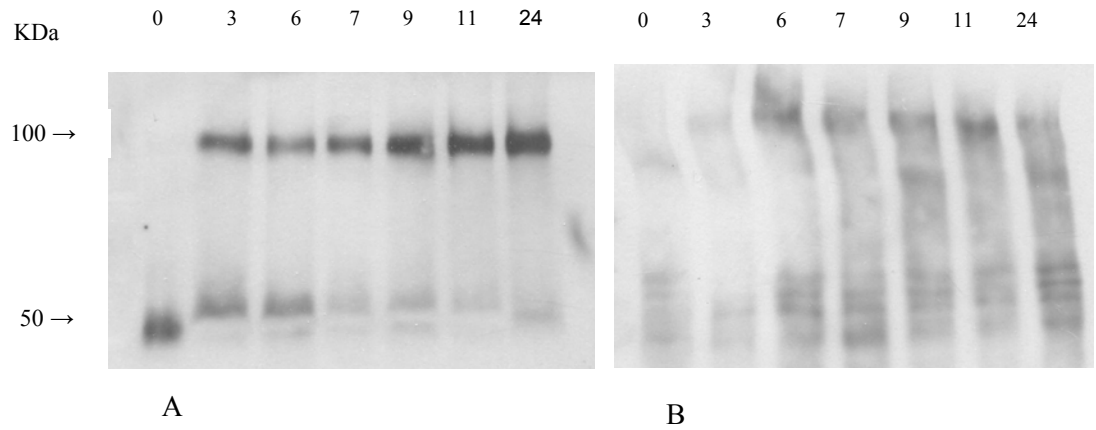


Figura 15: Análise da presença de fibronectina na fração solúvel do cultivo celular: 1 – PBS (0,3); 2 – extrato de C:M:H<sub>2</sub>O de tripomastigota (0,9); 3 – Tc85-45 (0,9); 4 – mucina (1,0); 5 – vesícula total (1,0); 6 – extrato de C:M:H<sub>2</sub>O de vesícula (0,9). Revelado com anticorpo anti-fibronectina. Os valores entre parênteses referem-se à padronização das figuras.

#### 4.5 Expressão de fibronectina ao longo do tempo

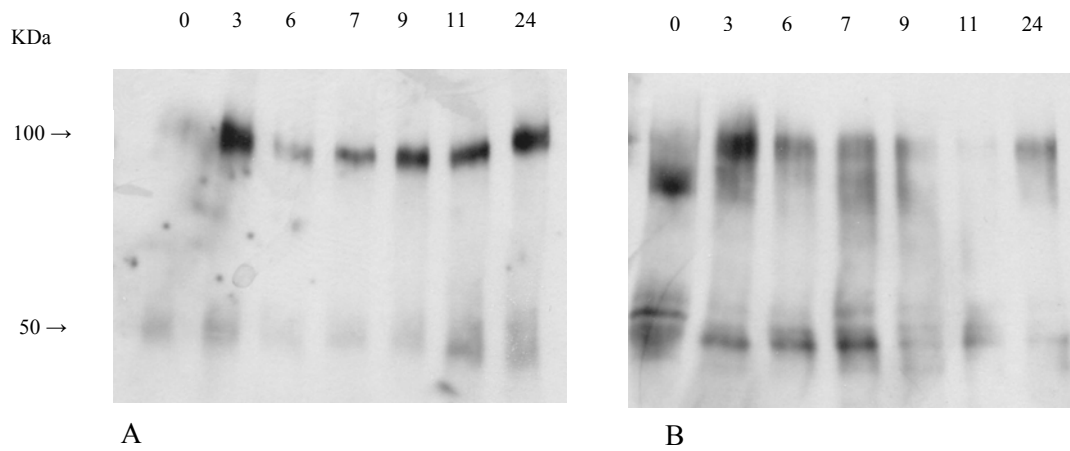
Ao verificarmos o aumento da deposição de fibronectina após 24 horas de incubação com vesículas totais, fomos verificar como se dá essa deposição ao longo do tempo. As culturas de células foram incubadas com 150 µg de vesícula total e as frações solúvel e insolúvel dos cultivos celulares coletadas após 0, 3, 6, 7, 9, 11 e 24 horas e analisadas por Western blot. Verificamos que a deposição de fibronectina na fração insolúvel aumenta ao longo do tempo (figura 16 A). Para a fração solúvel, observamos um aumento nos cultivos correspondentes a 9 e 11 horas após incubação (figura 16 B). Estes resultados são compatíveis com a maior quantidade de fibronectina encontrada nas frações insolúveis após a incubação da vesícula total por 11 e 24 horas.

Assim como para as vesículas totais, analisamos a expressão de fibronectina ao longo do tempo para as células incubadas com a fração C:M:H<sub>2</sub>O das vesículas pela técnica de Western blot. As culturas de células foram incubadas com a fração C:M:H<sub>2</sub>O das vesículas e coletadas as frações solúvel e insolúvel, dos cultivos celulares após 0, 3, 6, 7, 9, 11 e 24 horas. Na fração insolúvel observamos um pico de deposição de fibronectina após 3 horas de incubação, que não se manteve ao longo do tempo, pois na fração insolúvel coletada em 6 horas de incubação verificamos uma diminuição de deposição de fibronectina quando comparada com a fração coletada às 3 horas (figura 17 A). Nas demais horas as deposições se mantiveram constantes entre si, porém menores quando comparadas à fração coletada às 3 horas e maiores do que a fração coletada após 6 horas de incubação (figura 17 A). Na fração solúvel do cultivo celular não houve uma diferença significativa. (figura 17 B).



Tempo de incubação (horas)	Fração insolúvel (A)	Fração solúvel (B)
0	-	-
3	0,9	1,0
6	1,0	1,5
7	1,2	1,4
9	1,7	2,4
11	2,5	2,7
24	3,2	1,6

Figura 16: Análise da presença de fibronectina ao longo do tempo na presença de vesículas totais. A - fração insolúvel do cultivo celular; B – fração solúvel do cultivo celular. C – Valores de padronização das figuras A e B (razão de fibronectina/IgG de coelho). Revelado com anticorpo anti-fibronectina.



Tempo de incubação (horas)	Fração insolúvel (A)	Fração solúvel (B)
0	0,7	0,4
3	3,4	1,6
6	1,4	1,3
7	1,4	1,1
9	1,6	1,0
11	1,6	0,7
24	1,8	1,6

C

Figura 17: Análise da presença de fibronectina ao longo do tempo na presença da fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas. A - fração insolúvel do cultivo celular; B – fração solúvel do cultivo celular. C – Valores de padronização das figuras A e B (razão de fibronectina/IgG de coelho). Revelado com anticorpo anti-fibronectina.

Para confirmar se há realmente um pico de deposição de fibronectina após incubação com a fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas após 3 horas, o ensaio foi repetido coletando-se agora as frações solúveis e insolúveis dos cultivos celulares nos tempos zero, 30 min, 1, 2, 3 e 4 horas. Observamos na fração insolúvel dos cultivos celulares, que após 1 hora de incubação já há a presença significativa de fibronectina (figura 18 A), que aumenta nos cultivos celulares incubados por 3 e 4 horas com a fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas (figura 18 A). Já quando analisamos a fração solúvel, verificamos que há uma grande quantidade de fibronectina presente após 3 horas de incubação (figura 18 B).

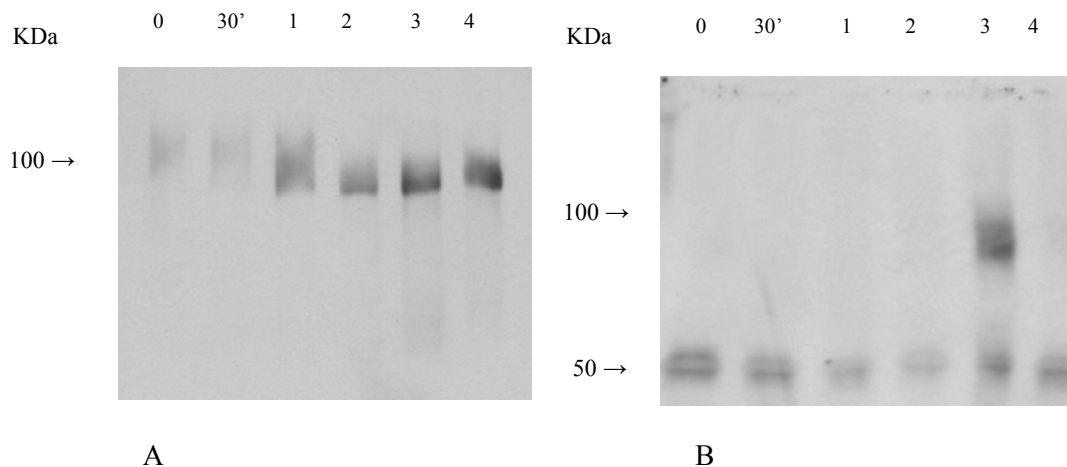
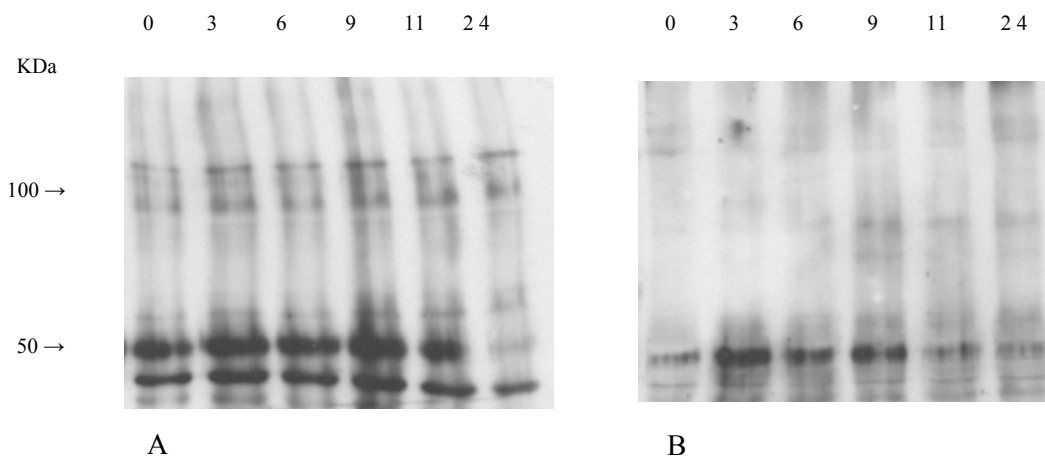


Figura 18: Análise da presença de fibronectina ao longo do tempo na presença da fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas. A - fração insolúvel do cultivo celular; B - fração solúvel do cultivo celular. Revelado com anticorpo anti-fibronectina. Valores de padronização da figura A: zero h = 0,4; 30 min = 0,5; 1 h = 1,8; 2 hs = 2,3; 3 hs = 3,3; 4 hs = 3,2.

Para controle dos ensaios de deposição de fibronectina ao longo tempo, as culturas de células foram incubadas com meio DEM com 10% de soro fetal bovino e

coletado a fração solúvel e insolúvel após 0, 3, 6, 9 11 e 24 horas após incubação. Não detectamos nenhuma alteração de fibronectina tanto na fração solúvel quanto na insolúvel (Figura 19 A e B), dando assim credibilidade aos ensaios realizados com vesículas totais e fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas.



Tempo de incubação (horas)	Fração insolúvel (A)	Fração solúvel (B)
0	0,5	0,3
3	0,7	0,4
6	0,5	0,4
9	0,8	0,3
11	0,7	0,5
24	0,8	0,4

C

Figura 19: Análise da presença de fibronectina ao longo do tempo em células epiteliais incubadas com a fração C:M:H<sub>2</sub>O de meio de cultura DME 5% de SFB. A - fração insolúvel do cultivo celular; B - fração solúvel do cultivo celular. C - Valores de padronização das figuras A e B (razão de fibronectina/IgG de coelho). Revelado com anticorpo anti-fibronectina.

#### 4.6 Relação dose-resposta

Ao verificarmos o aumento de fibronectina ao longo do tempo tanto para cultivos celulares incubados com vesículas totais quanto para os incubados com extratos C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas fomos averiguar se este aumento é dependente da concentração dos compostos adicionados.

Neste ensaio,  $1 \times 10^5$  células LLC-MK<sub>2</sub> foram incubadas por 24 horas com as seguintes concentrações de vesículas totais: 1,5, 15, 45, 60, 90, 120, 150 e 250  $\mu\text{g}$ . Após este período, separamos as frações solúvel e insolúvel e em seguida, estas frações foram submetidas à técnica de Western blot (figura 20).

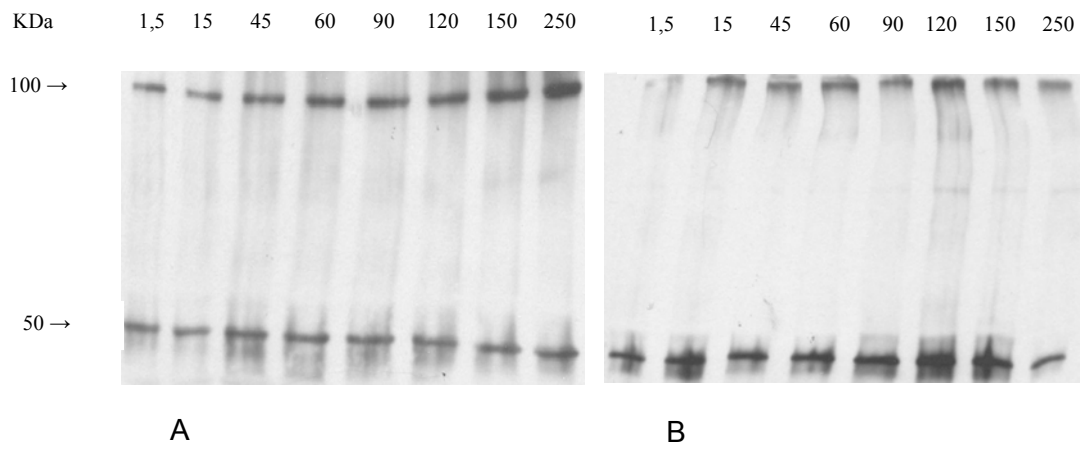
Observamos na fração insolúvel, que a presença de fibronectina nos cultivos celulares aumenta conforme a concentração de vesículas totais também aumenta (figura 20 A). Na fração solúvel dos cultivos celulares, a presença de fibronectina permanece praticamente constante em todas as quantidades de vesículas totais utilizadas nas incubações, a partir de 1,5  $\mu\text{g}$  (figura 20 B). Podemos concluir que a deposição de fibronectina pelas células epiteliais é proporcional à concentração de vesícula utilizada.

Após verificarmos que a deposição de fibronectina é dependente da concentração de vesículas totais, verificamos como se comportava esta deposição em diferentes concentrações da fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas. As concentrações de lipídeos foram calculadas a partir do equivalente do parasita para obtenção da quantidade (em  $\mu\text{g}$ ) de vesículas como descrito anteriormente ( $1 \times 10^8$  parasitas equivalem  $\approx 150 \mu\text{g}$  de vesículas totais). As células foram cultivadas e incubadas por



três horas com as quantidades equivalentes de vesícula do extrato lipídico: 1,5, 15, 45, 60, 90, 120, 150 e 250  $\mu\text{g}$  da fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas. Escolhemos incubar as células por 3 horas, pois, nos ensaios de deposição ao longo do tempo, os cultivos celulares incubados com extratos de C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas apresentaram uma maior deposição de fibronectina após três horas de incubação. Em seguida foram separadas as frações solúvel e insolúvel e submetidas à análise por Western blot.

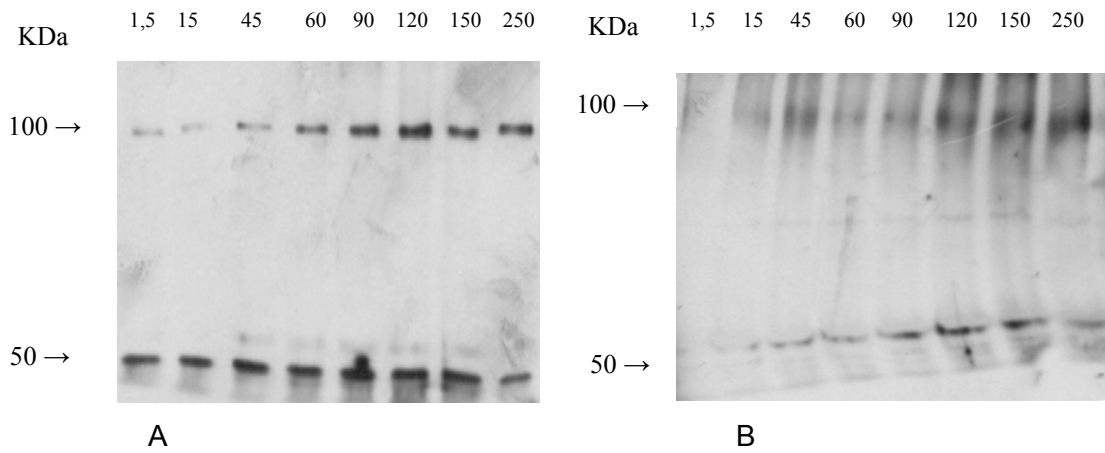
Verificamos que nas frações insolúvel e solúvel dos cultivos celulares há um aumento de fibronectina. Na fração insolúvel o aumento de deposição ocorre a partir de incubações com extratos correspondentes a 90  $\mu\text{g}$  (figura 21 A). As células incubadas com 250  $\mu\text{g}$  de extrato C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas apresentaram a maior deposição de fibronectina (figura 21 A).



Concentração de vesículas (µg)	Fração insolúvel (A)	Fração solúvel (B)
1,5	0,5	0,3
15	0,9	0,8
45	1,0	1,0
60	1,5	1,0
90	1,7	1,0
120	2,1	0,9
150	3,5	1,1
250	3,9	1,4

C

Figura 20: Análise da presença de fibronectina em células epiteliais incubadas com diferentes concentrações, em µg, de vesículas totais. A - fração insolúvel do cultivo celular; B - fração solúvel do cultivo celular. C - Valores de padronização das figuras A e B (razão de fibronectina/IgG de coelho). Revelado com anticorpo anti-fibronectina.



Concentração de C:M:H <sub>2</sub> O de vesículas (µg)	Fração insolúvel	Fração solúvel
	(A)	(B)
1,5	1,1	0,5
15	0,8	0,5
45	0,9	0,5
60	1,1	0,6
90	2,3	0,9
120	3,7	0,9
150	3,5	1,0
250	4,0	1,5

C

Figura 21: Presença de fibronectina em células epiteliais incubadas com diferentes concentrações, em µg, da fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas. A - fração insolúvel do cultivo celular; B - fração solúvel do cultivo celular. C - Valores de padronização das figuras A e B (razão de fibronectina/IgG de coelho). Revelado com anticorpo anti-fibronectina.

## 5. DISCUSSÃO

Nosso trabalho teve por finalidade estudar a expressão de fibronectina e laminina em células epiteliais, na presença de vesículas liberadas pelo *Trypanosoma cruzi* e alguns de seus constituintes. Iniciamos provocados por uma observação de Nde *et al.* (2006) pela qual a adição de gp83 à cultura de células induzia a expressão de laminina  $\gamma 1$ . O mesmo grupo notou também a participação de trombospondina-1 (Simmons *et al.* 2006) na infecção pelo parasita e a indução de expressão dessa molécula na presença de *T. cruzi*. Pinho *et al.* (2002) haviam demonstrado por imunocitoquímica de fibroblastos e células epiteliais incubadas com vesículas, um aumento de laminina, fibronectina e colágeno.

Como as vesículas liberadas constantemente por *T. cruzi*, fenômeno descoberto em nosso laboratório (Gonçalves *et al.* 1991) contém expressiva quantidade de Tc-85 (Alves & Colli 2007; Yoshida 2005), molécula que faz parte da família da glicoproteínas gp85/trans-sialidases e considerando a observação de Nde *et al.* (2006) empreendemos este trabalho a fim de verificar a participação de moléculas dessa família na indução de expressão de componentes da matriz extracelular pelas vesículas.

Para realizar os experimentos, escolhemos o clone 45 clonado em nosso laboratório, tendo em vista que essa molécula contém, na seqüência, o motivo RGD, importante sítio de adesão a integrinas de diversas células (Pytela *et al.* 1995), além de conter o domínio FLY, conservado em todos os membros da família. O peptídeo

J, que contém o domínio FLY, foi escolhido para este trabalho por ser o peptídeo mais estudado em nosso laboratório e que apresentou resultados importantes descritos na introdução.

Em nossos resultados, utilizando técnicas imunocitoquímicas, observamos quantitativa e qualitativamente um aumento de expressão de laminina para as culturas celulares que foram incubadas com vesículas e, em menor escala, com Tc85-45. Porém a técnica de Western blot não confirmou estes resultados, pois, todos os ensaios com vesículas, Tc85 e peptídeo J levaram a resultados que não diferiram significativamente dos controles, tanto nos ensaios realizados com cultivos celulares totais quanto em suas frações solúvel e insolúvel. Não conseguimos compreender totalmente essa discrepância tendo em vista os resultados positivos já publicados de Nde *et al.* (2006) e Pinho *et al.* (2002). É possível que nossas observações microscópicas reflitam a observação de poucos campos onde houve aumento visível por imunocitoquímica, mas o efeito não foi observado por métodos que avaliam uma média de toda a amostra, como é o caso do Western blot.

Em nossos experimentos fica claro que a incubação das células com vesículas, mas não com Tc85-45 ou peptídeo J, leva a um aumento significativo de células reativas com o anticorpo anti-fibronectina (Fig. 4, 11 e 12). Quando quantificamos esse aumento em ensaios de Western blot, padronizando-se devidamente as áreas das diferentes bandas contra um padrão de imunoglobulina externo, sejam com extratos totais, frações solúvel e insolúvel dos cultivos celulares, apenas as células incubadas com as vesículas apresentam um aumento representativo de fibronectina. Esses resultados confirmam que apenas as vesículas interferem na expressão de fibronectina e que provavelmente não é o grupo das

glicoproteínas Tc85 que induz este aumento, uma vez que os resultados obtidos para esta molécula não diferem dos controles. Aventamos a possibilidade de que as mucinas – outro componente presente nas vesículas – pudessem ser responsáveis pelo aumento de expressão de fibronectina. Finalmente, dedicamo-nos também à investigação do possível papel dos componentes lipídicos no fenômeno.

Nesta segunda etapa do trabalho, tanto os resultados obtidos por imunocitoquímica quanto por Western blot nos levaram a excluir as mucinas como sendo as responsáveis pelo aumento da expressão de fibronectina. O mesmo aconteceu com a fração lipídica combinada, extraída das vesículas com clorofórmio: metanol (1:2, 1:1, 2:1 v/v) que extrai fosfolipídeos e lipídeos neutros. No entanto, prosseguindo-se a extração do restante da fração lipídica com clorofórmio:metanol:água (1:2:0,8 v/v/v) encontramos uma fração que parece conter os agentes indutores do aumento de fibronectina.

Apesar de não podermos eliminar por completo a possibilidade de que a fração C:M:H<sub>2</sub>O contenha restos de proteínas, é forte a sugestão de que algum tipo de lipídeo contido nessa fração seja o responsável pela alteração da expressão de fibronectina. Musacchio *et al.* (2006) demonstraram por RT-PCR que ácidos graxos insaturados aumentam a expressão de fibronectina em osteoblastos humanos. Richardson *et al.* (2004) sugerem aumento na transcrição de genes que codificam componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno, pela fusão de ácidos graxos livres no plasma com células do músculo esquelético. As vesículas liberadas por *Trypanosoma cruzi* poderiam estar induzindo a expressão de fibronectina por meios semelhantes.

Nos ensaios realizados com vesículas, a expressão de fibronectina medida na fração insolúvel aumenta gradualmente com o tempo de incubação (Fig. 16). Na fração solúvel, parece que a expressão da proteína se dá maximamente até 11 horas de incubação, o que seria esperado já que o máximo de deposição externa ocorre às 24 horas.

Quando analisamos a expressão no decorrer do tempo para cultivos celulares incubados com a fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas verifica-se que a expressão de fibronectina é proporcional ao tempo, mas o máximo de expressão é atingido em tempos menores (3 horas) quando medida na fração solúvel.

Usando vesículas para induzir aumento de expressão de fibronectina verificamos alguma correlação entre concentração de vesículas adicionadas nos cultivos celulares e expressão de fibronectina. Esse aumento parece saturar com 150 µg de vesículas. Para as culturas celulares incubadas com diferentes quantidades da fração C:M:H<sub>2</sub>O de vesículas a resposta parece ser proporcional com expressão significativa com quantidades superiores a 90 µg (equivalente em vesículas). Agusti et al 2000 já haviam demonstrado que, embora os parasitas fossem ricos em fosfatidiletanolamina e lisofosfatidiletanolamina, o meio de cultura após incubação com formas tripomastigotas não contém quantidades significativas desses fosfolipídios. Por outro lado, esse mesmo meio é rico em ácidos graxos insaturados principalmente C<sub>16:1</sub> e C<sub>18:1</sub> e contém fosfatidilcolina e lisofosfatidilcolina (Agusti et al 2000). No entanto, essas medidas não foram feitas nas vesículas isoladas, mas no sobrenadante de cultura e fosfatidilcolina comercial, adicionada ao meio, não induziu a expressão de fibronectina.

As extrações com clorofórmio:methanol (2:1, 1:1, 1:2 v/v) praticamente eliminam todos os lipídeos neutros e os fosfolipídeos e mesmo alguns pequenos glicolipídeos menos polares. Por isso, o extrato de clorofórmio:metanol:água (1:2:0,8 v/v/v) é constituído por lipídeos e glicolipídeos bem polares tais como glicoesfingolipídeos e glicosilinositolfosfolipídeos. Tendo em vista a abundância dos fosfolipídeos é possível que alguns possam ter permanecido nesse extrato, particularmente os liso-fosfolipídeos. O laboratório está prosseguindo na identificação dos componentes responsáveis pela indução da expressão de fibronectina.

Durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, os componentes de matriz extracelular apresentam papéis importantes. A fibronectina pode ser uma ponte para a associação do parasita à célula e em nosso laboratório a Tc85-11 foi caracterizada como uma proteína ligadora de laminina (Giordano *et al.* 1999). Além disso, a matriz extracelular sofre alteração durante a infecção pelo parasita. Muitos autores sugerem que a alteração da modulação e da expressão da matriz extracelular, durante a infecção, está relacionada à resposta imune. Antígenos liberados pelo parasita ativam células inflamatórias e seus produtos, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e quimiocinas que poderiam contribuir para o aumento da expressão dos componentes de matriz extracelular. Marino *et al.* (2003) sugerem que as alterações da matriz extracelular durante a infecção dependem de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas produzidas pelas células infectadas pelo parasita ou sensibilizadas pelos seus antígenos, levando à fibrose do miocárdio, uma característica típica da doença de Chagas. Na fase aguda da doença há um aumento de proteínas da matriz extracelular presente no miocárdio, incluindo fibronectina (Garg *et al.* 2003). Nossos achados podem contribuir para o melhor



entendimento do processo das modificações ocorridas na matriz extracelular durante a infecção pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, podendo as vesículas e seus componentes lipídicos, de alguma forma contribuir, juntamente com a resposta imune do hospedeiro, para que haja as modificações na matriz extracelular e ocorra o sucesso da infecção.

## 6. CONCLUSÕES

- O clone 45 da proteína Tc-85, as mucinas e o peptídeo J não estão envolvidos no aumento da expressão de componentes (laminina e fibronectina) de matriz extracelular em células epiteliais LLC-MK<sub>2</sub>;
- As vesículas liberadas por *Trypanosoma cruzi* apresentam capacidade de aumentar a expressão de fibronectina, mas, aparentemente, não de laminina;
- Lipídeos extraídos das vesículas com Clorofórmio:Metanol:H<sub>2</sub>O estão envolvidos no aumento de expressão de fibronectina em células epiteliais LLC-MK<sub>2</sub>;
- Em células incubadas com vesículas ou com lipídeos delas extraídos, a expressão de fibronectina é dependente do tempo de incubação e da quantidade de vesículas ou de extrato presentes na cultura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Serrano A, Almeida IC, Freitas-Junior LH, Yoshida N, Schenkman S. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol Biochem Parasitol.* **2001**; 114:143-150.
- Agusti R, Couto AS, Alves MJM, Colli W, Lederkremer RM. Lipids shed the culture medium by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2000**; 95(1):97-102.
- Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJM. *Trypanosoma cruzi*: characterization of in intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol.* **1999**; 92(4) 263-275.
- Alves MJM & Colli W. *Trypanosoma cruzi*: Adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life.* **2007**; 59 (4-5):274-279.
- Alves MJM. Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. *Braz J Med Biol Res.* **1996**; 29:831-833.
- Alves MJM., Abuin G, Kuwijima VJ, Colli W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **1986**; 21:75-82.
- Amichai Y, Shlomo R. Binding of host extracellular matrix proteins to *Mycoplasma fermentans* and its effect on adherence to, and invasion of HeLa cells. *FEMS Microbiol Lett.* **2007**; 266:158-162.

- Andrews NW. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian J Med Biol Res.* **1994**; 27:471-475.
- Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J.Cell. Fysiol.* **2007**; 213:565-573.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann R Microbiol.* **1973**; 27:347-382.
- Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP133 as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Mol Biochem Parasitol.* **1992**; 50(2): 307-315.
- Burleigh BA, Woolsey AM. Cell and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell microbiol.* **2002**; 4(11):701-711
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch ACC, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nature Microbiology.* **2006**; 4:229-236.
- Buschiazzo A, Campetella O, Frasch AC. *Trypanosoma rangeli* sialidase: cloning, expression and similarity to *T. cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology* **1997**; 7:1167-1173.
- Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MNL, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression. *Exp Parasitol.* **2004**; 107:20-30.
- Cella N, Contreras A, Latha K, Rosen JM, Zhang M. Maspin is physically associated with  $\beta$ 1 integrin regulation cell adhesion in mammary epithelial cells *The FASEB Journal.* **2006**; 20:E721-E731.

- Colli W. Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. FAEB Journal. **1993**; 7:1257-1264.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. **2007**; 102(1):113-122.
- Cross GAM, Takle GB. The surface trans-sialidases family of *Trypanosoma cruzi*. Annual Review of Microbiology. **1993**; 46:385-411.
- De Oliveira Jr FOR., Alves CR, Calvet CM, Toma L, Bouças RI, Nader HB, Côrtes LMC., Krieger MA, Meirelles MNSL, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins and the nature of the host cell heparan sulfate-binding domain. Microbial Pathogenesis **2008**; 44:329–338.
- De Sousa W.. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current Pharmaceutical Desing. **2002**; 8:269-285.
- Díaz JCP. Mecanismo de transmissão. Em: Brener Z, Andrade, ZA, editores. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; **1979**. p.152-174.
- Egima CM, Briones MR, Freitas Junior LH, Schenkman RP, Uemura H, Schenkman S. Organization of trans-sialidase gene in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. **1996**; 77:115-25
- Ekblom M, Falkm M, Salmivirta K, Durbeej M, Ekblom P. Laminin isoforms and epithelial development. Ann NY Acad Sci. **1998**; 857:94-211.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A.N, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westernberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, Da Silveira JF, De Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K., Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin M.J, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C. Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andreson B. The genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. **2005**; 309:409-415.

Frasch ACC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. **2000**; 16(7): 282-286.

Garg N, Vsevolod, LP, Cao Y, Papaconstantinou J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implication in chagasic myocarditis development. *Biochim and Biophysic Acta*. **2003**; 1638:106-120.

Giomarelli B, Visai L, Hijazi Z, Rindi S, Ponzio M, Iannelli F, Speziale P, Pozzi G. Binding of *Streptococcus gordonii* to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett*. **2006**; 265:172-177.

- Giordano R, Fouts D, Tewari D, Colli W, Manning J, Alves MJM. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem.* **1999**; 274:3461-3468.
- Gonçalves MF, Umezawa ES, Katzin AM, De Sousa W, Alves MJM, Zingales B, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: shedding, of surface antigens as membrane vesicles. *Experimental Parasitology.* **1991**; 72:43-53.
- Guan JL, Hynes RO. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor  $\alpha 4\beta 1$ . *Cell.* **1990**; 60:53-61.
- Hakamori S, Fukuda M, Sekiguchi K, Carter WG. Fibronectin, laminin, and other extracellular glycoproteins. Em: Picz KA, Reddi AH, editores. *Extracellular Matrix Biochemistry.* New York: Elsevier; **1984.** p.229-276.
- Hanahan D. Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* **1983**; 166:557-580.
- Hauck CR. Cell adhesion receptors – signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med Microbiol Immunol (Berlim).* **2002**; 191(2):55-62.
- Hynes RO. *Fibronectins.* Springer-Verlag Inc, New York. **1990.**
- Hynes R.O. Molecular biology of fibronectin. *Annu Rev Cell Biol.* **1985**; 1:67-90.
- Ilg T, Stierhof YD, McConville MJ, Overath P. Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Cell Biol.* **1995**; 66(2):205-215.

- Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells. Laminin 10/11 mediates cell adhesion through integrin  $\alpha 3\beta 1$ . *J Biol Chem.* **1998**; 273:15854-15859.
- Kornblihtt ARV, Ibe-Pedersen K, Baralle FE. Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins. *Proc. Natl Acad Sci USA.* **1983**; 80:3218-3222.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Nat.History.* **1979**; 163 (art 3).
- Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med.* **1988**; 168:649-659.
- McKeown-Longo PJ, Mosher DF. Binding of plasma fibronectin to cell layers of human skin fibroblasts. *J Cell Biol.* **1983**; 97:466-472.
- Magdesian MH, Giordano R, Ulrich H, Juliano MA, Juliano L, Schumacher RI, Colli W, Alves MJM. Infection by *Trypanosoma cruzi*: Identification of parasite ligand and its host cell receptor. *The Journal of Biological Chemistry.* **2001**; 276(22):19382-19389.
- Mao Y, Schwarzbauer E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biology.* **2005**; 24:389-399.
- Marino APMP, Silva AA, Pinho RT, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix adhesion and chemoattractant molecules. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* **2003**; 36:1121-1133



- Marques MA, Antonio VL, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani MC. Binding of  $\alpha$ 2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J Med Microbiol.* **2001**; 50:23-28.
- Marroquin-Quelopana M, Oyama-Jr S, Pertinhez TA, Spisni Juliano MA, Juliano L, Colli W, Alves MJM. Modeling the *Trypanosoma cruzi* Tc85-11 protein and mapping the laminin-binding site. *Biochem Biophys Res Commun.* **2004**; 325:612-618.
- Mendes-Gionnini, MJS, Andreotti PF, Vincenzi LR, Da Silva, JLM, Lenzi HL, Benard G, Zancopé-Oliveira R, Guedes HLM, Soares CP. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes and Infection.* **2006**; 8:1550-1559.
- Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **1999**; 94(1):401-4.
- Mortara RA, Andreoli WK, Taniwaki NN, Fernandes AB, Silva CV, Fernandes MC, L'Abbate C, Silva S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. *An Acad Bras Cienc.* **2005**; 77:77-94.
- Mortara RA, Da Silva S, Araguth MF, Blanco SA, Yoshida N. Polymorphism of the 35- and 50- kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infect Immun.* **1992**; 60:4673-4678.
- Mortara RA. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol.* **1991**; 73:1-14.

- Musacchio E, Priante G, Budakovic A, Baggio B. Effects of unsaturated free fatty acids on adhesion and gene expression os extracellular matrix macromolecules in human osteoblast-like. *Connective Tissue Research*. **2007**; 48:34-38
- Nde PN, Simmons KJ, Kleshchenko YY, Pratap S, Lima MF, Villalta F. Silencing of the laminin  $\gamma$ -1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. **2006**; 7(3):1643-1648.
- Neira I, Silva FA, Cortez M., Yoshida N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*. **2003**; 71(1):557-561.
- Nisida IV, Amato-Neto L, Braz LM, Duarte MI, Umezawa ES. A survery of congenital Chagas`s disease, carried out at three health institutons in São Paulo City, Brasil. *Ver do Inst de Méd Trop de São Paulo*. **1999**; 41(5):305-311.
- Ohashi T, Kiehart DP, Erickson HP. Dual labeling of the fibronectin matrix and actin cytoskeleton with green fluorescent protein variants. *J Cell Sci*. **2002**; 115:1221-1229.
- Ohashi T, Kiehart DP, Erickson HP. Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1999**; 96:2153-2158
- Ortega-Barria E, Pereira ME. A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*. **1991**; 18: 411-421.

- Ouaissi MA, Afchain D, Capron A, Grimaud JA. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature*. **1984**; 308:380-382
- Ouaissi MA, Cornette J, Capron A. *Trypanosoma cruzi*: modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. *Eur J Immunol*. **1985**; 15:1096-1101.
- Ouaissi MA, Cornette J, Capron A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol Biochem Parasitol*. **1986**; 19:201-211.
- Ouaissi MA. Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitol Today*. **1998** 4(6):169-173.
- Pethe K, Bifani P, Drobecq H, Sergheraert C, Debie AS, Locht C, Menozzi FD. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2002**; 99:10759-10764.
- Pinho RT, Vannier-Santos MA, Alves CR, Marino AP, Castello Branco LR, Lannes-Vieira J. Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding in non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. *Acta trop*. **2002**; 83:103-115.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. **2001**; 1:92-100.
- Previato JO, Jones C, Gonçalves LP, Wait R, Travassos LR, Mendonça-Previato L. O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. **1994**; 301(1):151-159.

- Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Identification and isolation of a 140 KDa cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell*. **1995**; 40(1):191-198.
- Ramirez MI, Ruiz RC, Araya JE, Da Silveira JF, Yoshida N. Involvement of the stage-specific 82 KDa adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect Immun*. **1993**; 61:3636-3641.
- Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, De Franco RA, Jenkinson CP, Mandarino LJ. Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *The J Biol Chem*. **2005**; 280(11):10290-10297.
- Rodriguez A, Samoff E, Rioult MG, Chung A, Andrews NW. Host cell invasion by tripanosomes requires lysosome and microtubule/kinesin-mediated transport. *J Cell Biol*. **1996**; 134(2):349-362.
- Roskelley CD, Desprez PY, Bissell MJ. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1994**; 91:12378-12382.
- Ruiz RC, Rigoni VL, Gonzalez J, Yoshida N. The 35/50 KDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol*. **1993**; 15:121-125.
- Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira ARL. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 KDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J*. **1997**; 324:129-137.

- Santori FR, Paranhos-Bacalla GS, da Silveira JF, Yamauchi LM, Araya JE, Yoshida N. A recombinant protein base dons the *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigot 82-kilodalton antigen that induces an effective immune response to acute infection. *Infect Immun.* **1996**; 64:1093-1099.
- Sasaki T, Fässler R, Hohenester E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol.* **2004**; 7:959–963.
- Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzmann R, Yamada Y. Laminin, a multidomain protein. The A chain has a Unique globular domain an homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J Biol Chem.* **1988**; 263:16536-16544.
- Sasaki M, Yamada Y. The laminin B2 chain has a multidomain structure homologous to the B1 chain. *J Biol Chem.* **1987**; 262:17111-17117.
- Schenkman S, Eichinger D, Pereira ME, Nussenzweig V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Annu Rev Microbiol.* **1994**; 48:499-523.
- Schenkman S, Eichinger D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol Today.* **1993**; 9:218-222.
- Schenkman S, Kurosaki T, Ravetch JV, Nussenzweig V. Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of nonphagocytic mammalian cells *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.* **1992**; 175:1635-1641.
- Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian. *Cell.* **1991**; 65:1117-1125.

- Schwarzbauer JE, Patel RS, Fonda D, Hynes RO. Multiple sites of alternative splicing of the rat fibronectin gene transcript. *EMBO*. **1987**; 113:1463-1473.
- Seyfang A, Mecke D, Duszenko M. Degradation, recycling, and shedding of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Protozool*. **1990**; 37(6): 546-552.
- Signorini P. Caracterização de dois novos membros da família Tc85 de *Trypanosoma cruzi*. [Dissertação] São Paulo (SP): Instituto de Química da USP, **2006**.
- Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, Reiner N E. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biology*. In press. **2008**
- Simmons KJ, Nde PN, Kleshchenko YY, Lima MF, Villalta F. Stable RNA interference of host thombospondin-1 blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *FEBS Letters*. **2006**; 580: 2365-2370.
- Tardieux I, Nathanson NH, Andrews NW. Role in host cell invasions of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free Ca<sup>2+</sup> transients. *J Exp Med*. **1994**; 179:1017-1022.
- Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for Tripanosome invasion of mammalian cells. *Cell*. **1992**; 71:1117-1130.
- Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E. Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol*. **2000**; 19:309-317.
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin: a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*. **1979**; 254:9933-9937.

- Tonelli RR. Diferenciação do *Trypanosoma cruzi* em células de mamíferos. [Tese]. São Paulo (SP): Instituto de Química da USP; **2003**.
- Torreilhas ACT, Tonelli RR, Pavanelli WR, Da Silva JS, Shumaker RI, De Souza W, Narcisa NC, Colli W, Alves MJM. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. In press. **2008**.
- Tunggal P, Smyth N, Paulsson M, Ott M. Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc Res Tech*. **2000**; 51:214-227
- Turner DC, Flier LA, Carbonetto S. Identification of a cell-surface protein involved in PC12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. *J Neurosci*. **1989**; 9:3287-3296.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Inter Journal Parasitol*. **2001**; 31:472-481.
- Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJM, Colli C. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem*. **2002**; 277:20756-20762.
- Velling T, Tiger CF, Ekblom P, Gullberg D. Laminin  $\alpha$  chains in colon carcinoma cell lines: detection of a truncated laminin  $\alpha$ 1 mRNA in Caco-2 cells. *Exp Cell Res*. **1999**; 248:627-633.
- Villalta F, Smith CM, Ruiz-Ruano A, Lima MF. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. *FEBS Lett*. **2001**; 505:383-388.

Vray B, Camby I, Vercruyse V, Mijatovic T, Bovin NV, Ricciardi-Castagnoli P, Kaltner H, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology*. **2004**; 14(7):647-657.

Wierzbicka-Patynowski, Schwarzbauer JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci*. **2003**; 116:3269-3276.

World Health Organization. Tropical Disease Research: (WHO - Progress Report 95-96 134pp). Geneva; **1997**.

Wirth JJ, Kierszenbaum F. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Immun*. **1984**; 133 (1):460-464.

Woolsey AM, Burleigh BA. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lisosomal compartments. *Cell Microbiol*. **2004**; 6:829-838.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci*. **2003**; 116:3611-3622.

Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Bras Acad Sci*. **2005**; 78(1):87-111.

Zhang L, Leggatt GR, Kalinna BH, Piva TJ, Mc Manus DP. Cloning and expression of cDNA encoding a nonintegrin laminin-binding protein from *Echinococcus granulosus* with localization of the laminin-binding domain. *Mol Biochem Parasitol*. **1997**; 87:183-192.



## 8. ANEXO

## Seqüência da proteína recombinante TC85-45

ILFTLEGDIH **Met** RGS HHHHHH **Met** AS **Met** TGGQQ **Met** GRD  
LYDDDDKDPTLIFVPQKTQVVPKGGTSQETKRDSFISPS  
LVSAGGVIAAFAEGQVYTVNAGRQREKTSSDVVAEYIDA  
TWDWSTLVGKVNESWKAHTVLGTTDGTDKRVDFFYYP  
TTTTKGNKVFLLAGSLYKHRQTVGNRTYSGFNLRLLELVV  
GDVREPTSSEPTERIKWGQIRSLLESTIAAHEGKWTGF  
LAAGGSGVL **Met** EDGTLVFPL **Met** ATNAAKDDYS **Met** IIYST  
DNGSTWALSTGVSPANCTDPRITEWDGSLL **Met** IVNCKY  
SQRVYESRD **Met** GTTWTEAIGTLPGVWTKSRLLSWDL  
RVEALITATIEGRKV **Met** LYTQ **RGD** FSGEKSERALYLWVT  
DNNRSFYFGPVG **Met** DNAVRWEFPSNLLYSDGKLHLLQQ  
RDNGEGSDLSLSRLTGELSTIKSVLSTWSQKDAFISSFSI  
PTAGLVAVLSDAASNGTWIDEYLCLNAAVTNATKVKDGF  
QLTESNSGVLWVFNTRDDNVRHVSLSHNFTLVASVTIEE  
VPSNSTLLL TATSANNNSNHT **Met** GLSYTADKKWET **Met** F  
EENKKTRRSTWVPKKEHQVAL **Met** LQVKKASVYIDGNSL  
GEEELPLKGEAPLELLYFCFGAGEDAGQKTNVK **VKNV**  
**FLYNRP**LNKGEFEA **Stop** SG

## **SÚMULA CURRICULAR**

### **DADOS PESSOAIS**

Nome: Viviana Barbosa Paes

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo, SP, Brasil. 24/03/1980

### **EDUCAÇÃO**

Colégio: E.E. Amadeu Olivério. São Bernardo do Campo, SP, Brasil. 1993.

Universidade: Centro Universitário Fundação Santo André. Santo André, SP, Brasil.  
2003. Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.

### **OCUPAÇÃO**

Bolsista de Mestrado, CNPq, 04/2006 a 03/2008.

# 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](#)