

ROBERTA FERREIRA CURA DAS NEVES

**Dinâmica de componentes da superfície celular  
de tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*  
pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener**



Dissertação apresentada ao Instituto de Microbiologia  
Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, visando a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências (Microbiologia)

**Orientador: Thaïs Souto-Padrón**

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Rio de Janeiro  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## *FICHA CATALOGRÁFICA*

Neves, Roberta Ferreira Cura das

Dinâmica de componentes da superfície celular de tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener / Roberta Ferreira Cura das Neves – Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, 2009.

xii, 83f.

Orientadora: Thaïs Souto-Padrón

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/ Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), 2009.

Referências bibliográficas: f. 58 - 83

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Shedding 3. Concanavalina A 4. Ferritina cationizada 5. Microscopia eletrônica 6. Citometria de fluxo I. Souto-Padrón, Thaïs. II. UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/ Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), 2009. III. Título.

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

## ***AGRADECIMENTOS***

Primeiramente a Deus, por sempre me proteger e iluminar meu caminho.

A Thaís por ter acreditado em mim e no meu trabalho, pela orientação, ensinamentos e por toda a compreensão durante esses dois anos. Obrigada por tudo!.

As minhas “florzinhas” do laboratório, Moa, Anne, Gabi, Cynthia e a mineirinha Flavinha pela nossa maravilhosa convivência, amizade, cumplicidade e “saidinhas”. Em especial a Cá por toda a amizade, ajuda nos experimentos, conversas e apoio em todos os momentos, sobretudo naqueles mais difíceis. Adoro muito vocês!.

Aos professores do IMPPG pelas sugestões e ensinamentos, especialmente, Marta Branquinha, Ângela Hampshire, Rosângela Soares, Antônio Pereira, Márcio Rodrigues, Eliana Barreto e Ulysses Lins.

A professora Ângela Hampshire pela revisão desta tese.

As “meninas” e o Fernando do laboratório do professor Ulysses pelas nossas conversas, festinhas e trocas de experiências “microscópicas”.

A todos os professores e amigos que fiz no Laboratório Hertha Meyer. Com certeza Chagas 2008 será inesquecível!

A todos os amigos que fiz em cursos, faculdade e no mestrado. Marcella, Anna Léa, Alexandre, Elisa, Maristela, Marteka, Susanão, Ana Cláudia e Lú, obrigada pela força de sempre. Não esquecendo da querida amiga Di que, embora distante, nos mantemos unidas, torcendo uma pela outra. Super obrigada a todos os meus amigos pelos nossos “papos” de corredor e internet, festinhas e encontros.

A todos da minha mais “nova família” Loyola Camorim por terem me aceitado como a “agregada Flávia Roberta” e por todo o incentivo, carinho e preocupação. Vocês são especiais!

Ao meu maravilhoso namorado, Rogério, pelo amor, companheirismo e amizade durante esses 4 anos juntos. Pela paciência e carinho, principalmente durante esses dois anos de mestrado. Minha vida não seria a mesma sem você ao meu lado. Amo você!

Aos meus tios e tias, primos e primas, aos meus queridos e amados avós, por terem me dado forças para lutar pelos meus objetivos, pelo amor e por terem compreendido, em alguns momentos, minha ausência. Vocês são essenciais na minha vida!

A minha madrinha, por iluminar a minha vida com toda sua alegria e por me ensinar que mesmo nos momentos mais difíceis temos que ter forças para lutar e alcançar nossos objetivos. Saiba que sempre estarei ao seu lado. Amo muito você!

A minha irmazinha Cris, que só de pensar já me emociono. Para você não há palavras, apenas agradeço por você existir. Obrigada por tudo, até mesmo os “puxões de orelha”. Amarte! Não podia esquecer do meu cunhado Ricardo pela amizade e estímulo.

Obrigada a todos que contribuíram nessa fase tão importante da minha vida!

### **Esta tese é dedicada**

**Aos meus pais, Glória e Roberto**, pelo amor incondicional, por minha formação como pessoa e como profissional, sempre me guiando e encorajando para seguir o melhor caminho. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês!

“Seus braços sempre se abrem quando preciso de um abraço. Seus corações sabem compreender quando preciso de um amigo. Seus olhos sensíveis se endurecem quando preciso de uma lição. A força e o amor de vocês me dirigem pela vida e me dão asas para voar”  
(Samantha Bader).

***Amo vocês!!!***

## **RESUMO**

Roberta Ferreira Cura das Neves

### **DINÂMICA DE COMPONENTES DA SUPERFÍCIE CELULAR DE TRIPOMASTIGOTAS DO *Trypanosoma cruzi* PERTENCENTES À CEPA Y AO CLONE CL-BRENER**

Orientadora: Thaís Souto-Padrón

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

No presente trabalho, analisamos o comportamento da superfície de formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener na presença de ferritina cationizada (FC) da lectina Concanvalina A (Con A). Observamos que a ligação da FC dispara o mecanismo de “shedding” dos seus sítios de reconhecimento nos parasitos da cepa Y, mesmo a 4°C e que esta movimentação não é tão acentuada em parasitos do clone CL-Brener. A ligação de Con A sobre os parasitos desencadeia o “shedding” de vesículas contendo a lectina em parasitos da cepa Y enquanto observamos uma intensa redistribuição dos sítios de ligação de Con A para o interior da bolsa e para região de adesão flagelo-corpo nos parasitos do clone CL-Brener. Tripomastigotas da cepa Y são mais susceptíveis a lise pelo anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal quando comparados ao clone CL-Brener e o “shedding” de componentes da superfície dos parasitos da cepa Y os protege da lise por anticorpos anti- $\alpha$ -gal. A modulação dos sítios ligadores de FC e Con A é discutido em relação à resistência a fatores do complemento, a ação de defensinas e de proteínas ligadoras de manose (MBPs) *in vivo*. A análise do material liberado por ambas as amostras em meio de cultura na ausência de soro (sobrenadante total) pelos tripomastigotas de ambas as amostras é semelhante tanto quantitativa quanto qualitativamente com peptídios variando entre 25 a 110 kDa. Observamos também no sobrenadante total atividades proteolíticas. Essas atividades são mais intensas em pH 5,5 em parasitos do clone CL-Brener e em pH 10 na cepa Y. A incubação dos parasitos na presença de PMA ativa a liberação de proteínas na cepa Y, observado pelo aumento da intensidade das bandas em SDS-GAGE e parece não afetar os parasitos do clone CL-Brener. A análise do meio de incubação dos parasitos por MET mostrou também a presença de vesículas variando de 40 a 250nm

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, Shedding, Concanvalina A, Microscopia eletrônica e Citometria de fluxo

Rio de Janeiro  
Julho de 2009



## ***ABSTRACT***

Roberta Ferreira Cura das Neves

### DYNAMICS OF CELL SURFACE COMPONENTS OF *Trypanosoma cruzi* TRYPOMASTIGOTES FROM THE Y STRAIN AND CL-BRENER CLONE.

Orientadora: Thaïs Souto-Padrón

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

In the present study, we analyzed the behavior of the surface of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* belonging to the Y strain and CL-Brener clone in the presence of cationized ferritin (CF) and the lectin Concanvalin A (Con A). We observed that CF triggers the shedding of their binding sites in Y strain parasites, even at 4 °C, and that this process was not as pronounced in parasites of CL-Brener clone. The binding of Con A to Y trypomastigotes triggered the shedding of Con A-containing vesicles whereas in CL-Brener parasites presented an intense redistribution of Con A binding sites into the flagellar pocket and to the flagellum-cell body adhesion region. Y strain trypomastigotes were more susceptible to lysis by Ch anti- $\alpha$ -gal antibody when compared to clone CL-Brener. Shedding of cell surface components, after incubation with CF and Con A, protected Y parasites from lysis by anti- $\alpha$ -gal. Cell surface modulation by FC and Con A was discussed in relation to the resistance to complement, the activity of defensins and mannose binding proteins (MBPs) *in vivo*. In the absence of serum (total supernatant), the material released by both types of trypomastigotes in the culture medium was similar to each other, ranging from 25 to 110 kDa. We also analyzed the proteolytic activities present in the supernatants. CL-Brener clone and Y strain activities were more intense at pH 5.5 and 10, respectively. The incubation of the parasites in the presence of PMA activated the release of proteins by the Y strain parasites, observed by an increase in intensity of bands in SDS-PAGE, whereas parasites of CL-Brener clone seem not to be affected by that. The analysis of the incubation medium under TEM showed the presence of membrane vesicles ranging from 40 to 250 nm.

**Key-Words:** *Trypanosoma cruzi*, Shedding, Concanvalin A, Cationized Ferritin, Electron Microscopy, Flow cytometry.

Rio de Janeiro  
Julho de 2009

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	1
1.1.1. Diversidade biológica entre as cepas do <i>T. cruzi</i> .....	2
1.2. Mecanismo de escape .....	5
1.3. Mecanismo de “shedding” .....	7
1.3.1. “Shedding” de ectodomínios .....	7
1.3.2. “Shedding” de vesículas de membrana .....	9
1.4. Modulação de componentes de superfície em Tripanosomatídeos.....	10
1.4.1. Proteases em tripanossomatídeos .....	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos .....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.1. Parasitos.....	18
3.2. Obtenção das células hospedeiras.....	18
3.3. Infecção das células hospedeiras.....	18
3.4. Efeito de Ferritina Cationizada e da lectina Concanavalina A na movimentação e shedding de componentes de superfície.....	19
3.5. Ensaio de lise pelo anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal .....	20
3.6. Ligação do anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal na ausência e presença de FC e ConA .....	20
3.7. Ensaio de Shedding .....	20
3.7.1. Avaliação da viabilidade dos parasitos após o ensaio de “shedding” .....	20
3.7.2. Isolamento das vesículas de membrana liberadas no meio de cultivo (Vesículas de shedding) .....	21
3.8. Avaliação de componentes liberados pelo <i>T. cruzi</i> no meio de cultura .....	21
3.8.1. Análise quantitativa das proteínas liberadas no meio de incubação.....	21
3.8.2. Análise do perfil protéico das diferentes amostras .....	22
3.8.3. Análise da atividade proteolítica das diferentes amostras .....	22
3.9. Análise da regulação do processo de “shedding” .....	23
3.10. Observação das vesículas de shedding por contrastação negativa.....	23
3.11. Processamento de amostras para microscopia de imunofluorescência .....	24

3.12. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	24
3.13. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	25
3.14. Análise por citometria de fluxo.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Mobilidade dos componentes de membrana .....	27
4.1.1. Comportamento dos sítios ligantes de FC .....	27
4.1.2. Comportamento dos sítios ligantes de Con A.....	31
4.1.3. Efeito da incubação com FC e ConA na lise de tripomastigotas por anticorpos.....	32
4.2. Avaliação das proteínas totais liberadas no meio pelo parasito na ausência de soro fetal bovino .....	40
4.3. Detecção das atividades proteolíticas totais obtidas durante ensaios de shedding .....	41
4.4. Influência do PMA no processo de shedding.....	42
5. DISCUSSÃO .....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

**ADAM:** desintegrina / metaloprotease (**a** disintegrin **and** metalloproteases)

**Ch anti  $\alpha$ -gal:** anticopor anti- $\alpha$ -galactose

**ConA:** lectina concanavalina A

**ConA-Au:** lectina concanavalina A conjugada com ouro coloidal

**ConA-FITC:** lectina concanavalina A conjugada FITC (**f**luorescein **i**sothiocy**a**nate)

**DTT:** ditioneitol

**E-64:** L-trans-epoxisuccinil L-leucilamida-(4-guanidino)-butano. Inibidor de cisteína proteínase.

**FC:** ferritina cationizada

**GPI:** glicosilfosfatidilinositol

**HBSS:** Solução Salina Balanceada de Hank's

**MET:** Microscopia Eletrônica de Transmissão

**MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura

**MMP:** metaloproteases da matriz (**m**atrix **m**etalloproteases).

**PBS:** salina tamponada com fosfato (**p**hosphate **b**uffered **s**aline)

**PKC:** proteína quinase C (**p**rotein **k**inase **C**)

**PMA:** 13-acetato de forbol 12-miristato. Ativador inespecífico de PKC.

**SAPA:** antígeno secretado de fase aguda (**s**hedded **a**cute **p**hase **a**ntigen)

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS)

**SFB:** Soro Fetal Bovino

**SI:** Sistema Imunológico

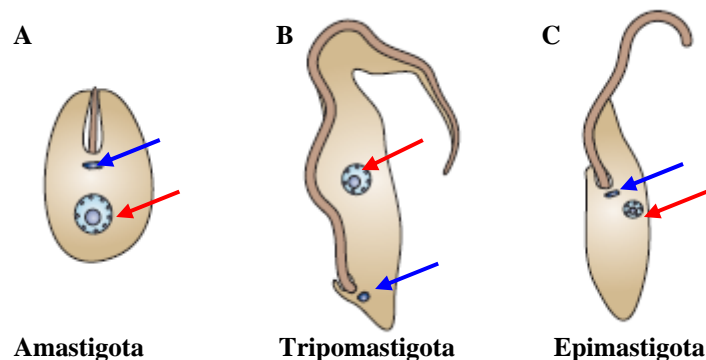
**VSG:** Glicoproteína variável de superfície

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Doença de Chagas e *Trypanosoma cruzi*

A Doença de Chagas é uma doença tropical, endêmica em grandes áreas das Américas do Sul e Central, que afeta cerca de 18 milhões de pessoas (WHO, 2002, MONCAYO, 2003, GARCIA ET AL., 2007). O seu agente etiológico é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, que apresenta um ciclo de vida heteroxênico alternando entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são insetos hematófagos, popularmente conhecidos como “barbeiros”, que pertencem à Classe Hemiptera, Família Reduviidae e subfamília Triatominae, sendo as principais espécies representantes *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*. Dentre os hospedeiros vertebrados podemos citar o homem, animais domésticos como o gato e o cão, e animais silvestres como roedores, primatas, o tatu e o gambá, sendo esses dois últimos considerados os animais reservatórios do parasito na natureza (revisão em DE SOUZA, 1984; ZINGALES & COLLI, 1985; TYLER & ENGMAN, 2000). Durante o seu ciclo biológico, o *T. cruzi* possui três formas de desenvolvimento: amastigota, tripomastigota e epimastigota (Fig.1) (revisão em DE SOUZA, 1984, 2002).



**Figura 1:** Formas de desenvolvimento do *T. cruzi* diferenciam-se morfológicamente pelo formato do corpo e localização do cinetoplasto (seta azul) em relação ao núcleo (seta vermelha) e região de onde o flagelo emerge da bolsa flagelar. (a) **Amastigota**, oval com cinetoplasto em forma de bastão localizado anteriormente ao núcleo e pequeno flagelo não aderido ao corpo do parasito; (b) **Tripomastigota**, alongado, cinetoplasto arredondado e posterior ao núcleo com flagelo longo percorrendo o corpo celular aderido à membrana plasmática; (c) **Epimastigota**, fusiformes, cinetoplasto em forma de bastão localizado antero-lateralmente ao núcleo e flagelo emergindo lateralmente no corpo celular (adaptado de DOCAMPO *et al.*, 2005).

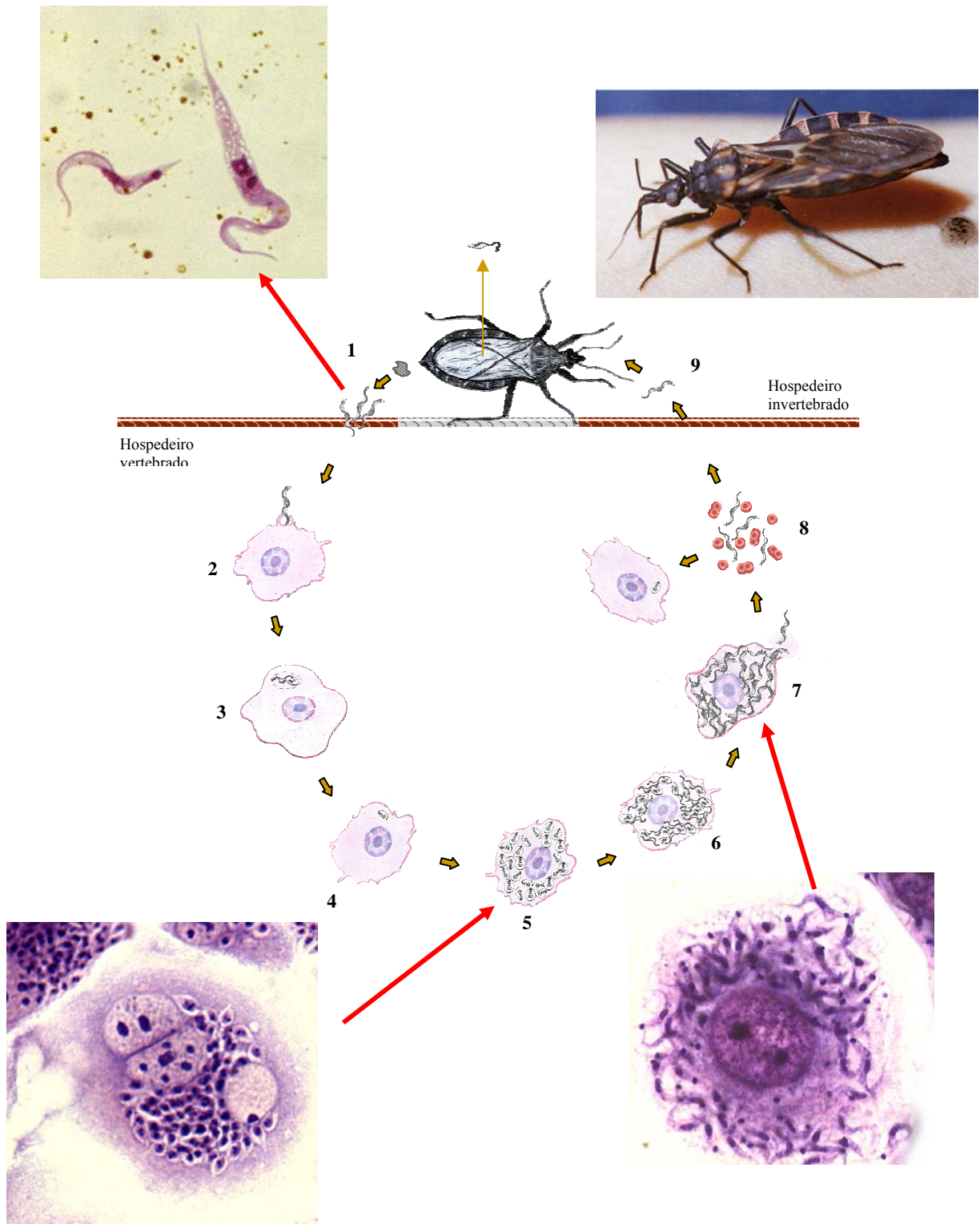
No inseto vetor o ciclo inicia quando este, durante o repasto sangüíneo, se alimenta de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo assim formas tripomastigotas sangüíneas. No lúmen do intestino do inseto vetor, as formas tripomastigotas se diferenciam e

proliferam sob a forma epimastigota. Estas formas colonizam o tubo digestivo do inseto e ao atingirem a ampola retal (porção final do intestino) se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, formas não proliferativas, que são eliminadas juntamente com as fezes e urina do inseto durante o repasto sanguíneo em um mamífero (BRENER & ALVARENGA, 1976). As formas metacíclicas penetram nas células do hospedeiro vertebrado (revisto por TYLER & ENGMAN, 2000) levando a formação de um vacúolo parasitóforo (ANDRADE & ANDREWS, 2004; DE SOUZA, 2005), do qual escapam (ANDREWS & WHITLOW, 1989; ANDREWS, 1994, ANDREWS *et al.*, 1990), para então alcançarem o citoplasma, onde se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Após vários ciclos de divisão, as formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas, que são liberadas pelo rompimento da célula infectada, podendo assim invadir células vizinhas ou infectar outros tecidos, caso sejam transportados pelas correntes sanguínea e linfática (BRENER & ALVARENGA, 1976; MORTARA *et al.*, 2005; ANDRADE & ANDREWS, 2005) (Fig.2).

#### 1.1.1. Diversidade biológica entre as cepas do *T. cruzi*

Estudos sobre o ciclo biológico *in vivo* e *in vitro*, realizados com diferentes cepas de *T. cruzi*, mostraram diferenças significativas no pico de parasitemia, no tropismo celular e na resistência ao sistema imune do hospedeiro vertebrado (BRENER, 1980), como ocorre nas cepas Y e CL (BRENER, 1977). A utilização de cepas com diferentes características como, por exemplo, diferentes graus de virulência é uma ferramenta importante na identificação de mecanismos de interação parasito-hospedeiro desenvolvidos por diferentes patógenos (ZINGALES & COLLI, 1985).

No caso do *T. cruzi*, a primeira evidência morfológica da diferença entre cepas é a quantidade relativa de formas tripomastigotas finas e largas, que podem ser observadas tanto no sangue de hospedeiros infectados, quanto no meio de cultivo de células. Embora não se saiba definitivamente qual é a verdadeira importância das formas largas e finas em *T. cruzi*, diferentemente do que é descrito em tripanosomas Africanos (VICKERMAN, 1962, 1969; BRENER, 1965), o fato é que se tomarmos como exemplo a cepa Y, observaremos que ela é composta principalmente por tripomastigotas finos, enquanto a cepa CL é composta primordialmente por tripomastigotas largos.



**Figura 2 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*.** (1) Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo infectado pelo *T. cruzi* libera, juntamente com as fezes e urina, formas tripomastigotas metacíclicas; (2) Estas formas penetram nas células do hospedeiro vertebrado (3) levando a da formação de um vacúolo parasitóforo, (4) do qual escapam, (5) para então alcançarem o citoplasma, onde se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam por divisão binária; (6) As formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas, (7) que são liberadas pelo rompimento da célula infectada, (8) podendo assim invadir células vizinhas ou infectar outros tecidos, caso sejam transportados pelas correntes sanguínea e linfática; (9) o inseto vetor ao se alimentar de sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, ingere formas tripomastigotas sanguíneas, que no lúmen do intestino do inseto vetor se diferenciam e proliferam sob a forma epimastigota (1) e ao atingirem a ampola retal se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, reiniciando o ciclo.

A capacidade de aglutinação na presença de lectinas e a influência de diferentes resíduos de açúcar na interação com células hospedeiras são distintas entre diversas cepas de *T. cruzi* (PEREIRA *et al.*, 1980). Essas duas características estão ligadas à composição do glicocálice dos parasitos e a capacidade de mobilidade de sítios de reconhecimento das lectinas (revisto em DE SOUZA, 1995). Estudos prévios mostraram que a ligação da lectina concanavalina A (ConA), que reconhece resíduos de manose e glicose, à superfície de formas tripomastigotas é capaz de mobilizar componentes de superfície, induzindo a formação de agregados destas moléculas nas regiões anterior e posterior do corpo do parasito (SZARFMAN *et al.*, 1980).

Outro açúcar importante na biologia do *T. cruzi* é o ácido siálico. Sua presença confere carga negativa à superfície das diferentes formas de desenvolvimento do *T. cruzi*, sendo a forma tripomastigota a mais negativa, seguida das formas amastigotas e finalmente dos epimastigotas (revisto em DE SOUZA, 1995). A carga de superfície é diferente para cada espécie de tripanosomatídeos estudada, no entanto, cepas e clones de uma mesma espécie apresentam valores médios de carga de superfície idênticos ou bem semelhantes. Observamos, porém, que em algumas cepas a carga de superfície dos indivíduos é mais concentrada em determinados valores, enquanto em outras a distribuição é mais alargada, criando com isto cepas mais ou menos homogêneas (revisto em DE SOUZA, 1995; ZINGALES & COLLI, 1985). A carga de superfície é um dos fatores que influencia diretamente a interação entre células. A distribuição de cargas entre indivíduos de uma cepa pode ser um fator decisivo para o sucesso ou insucesso do processo de adesão e internalização (ARAÚJO-JORGE & DE SOUZA, 1984; CIAVAGLIA, CARVALHO & DE SOUZA, 1993).

Um outro aspecto importante é a análise do repertório protéico das diferentes cepas do *T. cruzi*. Estudos têm demonstrado uma alta diversidade genética e, conseqüentemente uma grande heterogeneidade nas propriedades biológicas de diferentes cepas, acarretando diferenças no ciclo de vida (RUIZ *et al.*, 1998; WESTON, PATEL & VAN VOORHIS, 1999; RISSO *et al.*, 2004), na expressão de fatores de virulência (RISSO *et al.*, 2004), no tropismo celular (MELO & BRENER, 1978), na expressão de proteínas de superfície envolvidas na mobilização de  $Ca^{2+}$ , na capacidade do parasito penetrar em diferentes tipos celulares (RUIZ *et al.*, 1998) e, finalmente, na capacidade em escapar ou manipular/subverter o sistema imune do hospedeiro (KRETTLI & NUSSENZWEIG, 1977; CAMARGO *et al.*, 1997; GARZON *et al.*, 2005; OURY *et al.*, 2005; MATHIEU-DAUDÉ *et al.*, 2007).



## 1.2. Mecanismos de escape

Durante o curso das doenças parasitárias, na medida em que os hospedeiros e parasitos evoluem para se adaptarem uns aos outros, observa-se o desenvolvimento de mecanismos seletivos importantes, principalmente na manutenção da sobrevivência dos parasitos. Patógenos intracelulares obrigatórios necessitam evadir o sistema imune do hospedeiro, para garantir a sua sobrevivência e manutenção desses microorganismos (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1999). Alguns parasitos são capazes de produzir moléculas semelhantes às do hospedeiro, caracterizando um processo de mimetismo, que em *T. cruzi* é apontado como sendo o processo responsável pelo comportamento autoimune da doença de Chagas (BLOOM, 1979; VAN VOORHIS et al., 1991; GIRONÈS et al., 2005).

Um segundo mecanismo, denominado disfarce antigênico, também baseado na capacidade do parasito se “esconder” do sistema imune, é a apropriação de moléculas do hospedeiro, exibindo-as na sua superfície como albumina, heparina, identificadas na superfície de tripanossomatídeos (MUKHOPADHYAY, 1989; DWYER, 1976; HERRERA et al., 1994) e o fator acelerador do decaimento humano (DAF), que acelera a dissociação da C3 convertase tanto da via alternativa quanto da via clássica do sistema complemento identificado na superfície do *T. cruzi* (CAPRON & DESSAINT, 1989) e do *Schistosoma mansoni* (HORTA & RAMALHO-PINTO, 1991) e imunoglobulinas não específicas foram descritos em diversos parasitos como no *S. mansoni* (LOUKAS et al., 2001), os cestodas *Taenia crassiceps* (KALLINA & MCMANUS, 1993), *T. solium* (WHITE et al., 1997), *T. pisiformis* (GRAIG, 1988), *Echinococcus multilocularis* (ALKARMI et al., 1988) e *E. granulosus* (BAZ et al., 1998), os nematodos *Heligmosoides polygyrus* (ENRIQUEZ et al., 1992), protozoários como *Toxoplasma gondii* (VERCAMMEN et al., 1999) e espécies patogênicas da família Trypanosomatidae (VINCENDEAU & DAERON, 1989; MIRANDA-SANTOS & CAMPOS-NETO, 1981), além de bactérias como *Brucella abortus* (BRICKER et al., 1991) e *Streptococcus* spp. (RAEDER & BOYLE, 1993).

Além do mimetismo, muitos outros parasitos têm a capacidade de se isolar das agressões do ambiente em que se encontram, através do mecanismo de encistamento, como é o caso de *E. granulosus*, *Toxocara canis*, *Pneumocystis carinii*, *Entamoeba* ou ainda *Toxoplasma gondii*. O fato destes parasitos se manterem dentro de cistos, os protege não só da ação do SI como também de outras condições desfavoráveis (CAMUS et al., 1995; BLOOM, 1979).

Um quarto mecanismo de escape é a variação antigênica, observada em muitos patógenos importantes, como o *Plasmodium* sp e *T. brucei* (GUPTA, 2005). A superfície celular do *T. brucei* é composta principalmente por antígenos glicoprotéicos denominados glicoproteínas variáveis de superfície (VSG) que têm sua expressão controlada por diferentes

genes (FERGUSON & CROSS, 1984), mas apenas um único gene é expresso por vez (CROSS, 1996). A capacidade das formas sanguíneas de sintetizarem rapidamente as VSGs, em um tempo entre 1-2 horas, é possível devido ao controle da síntese de mRNA dessas moléculas. Estes genes se localizam no telômero de um cromossomo e sua transcrição se inicia a partir de um sítio de expressão (SE) encontrado no telômero. Uma cópia da VSG é duplicada para um cassete, translocada para a expressão local no telômero, tornando-se ativa. Alternativamente, alguns genes são expressos sem ser em duplicata. Nestes casos, o SE ativo em um cromossomo é silenciado e um outro sítio ativo no cromossomo é ativado (STOCKDALE *et al.*, 2008). Subseqüentemente, a VSG é liberada para o meio extracelular, através da hidrólise da âncora de GPI (BULLOW, NONNENGASSER & OVERATH, 1989) e ação de endoproteases (“shedding”), requerendo a participação de metaloproteases nesse processo (BANGS *et al.*, 2001).

A remoção de componentes de superfície também possibilita a evasão do sistema imune. Os constituintes da membrana plasmática são continuamente renovados através da exocitose, endocitose ou através do “shedding” (DANIAK, 1991). A exocitose é um processo importante para o aporte dos componentes da membrana plasmática, enquanto a endocitose permite que as células modulem a resposta a estímulos exógenos como, por exemplo, hormônios e fatores de crescimento. Este processo chama-se “down-regulation” pós-transcricional. É um fenômeno rápido, dependente do ligante e geralmente baseado numa endocitose acelerada, seguida de um direcionamento destes complexos receptor-ligante para uma via degradativa, tendo como principal função a inibição da geração contínua de sinais induzidos por estes ligantes (CARPENTER & COHEN, 1976). No *T. brucei*, sabe-se que quando as VSGs são reconhecidas pelo sistema imune, formando o complexo IgG-VSG, esses são encaminhados para compartimentos da via endocítica, onde a imunoglobulina é degradada e de onde as VSGs podem retornar à superfície celular (PAL *et al.*, 2003; OVERATH & ENGSTLER, 2004; FIELD *et al.*, 2007).

Um outro mecanismo de remoção de componentes da superfície celular se dá pelo “shedding” (liberação) de proteínas de membrana. A fluidez da membrana plasmática permite a redistribuição de proteínas de superfície, induzindo a formação de agregados de proteínas em algumas regiões da superfície celular, processo conhecido como “capping”, descrito pela primeira vez em linfócitos (NICOLSON, 1976). Algumas possíveis hipóteses existem para se explicar o papel funcional deste processo no *T. cruzi*. Uma delas é que estes agregados formados facilitem sua eliminação da superfície, através do mecanismo de “shedding”. Também é possível que esta mobilidade de antígenos de superfície induzida por anticorpos no *T. cruzi* ou em outros parasitos confira resistência às defesas do hospedeiro (DE SOUZA, 1984).

Segundo o modelo de “zipper”, a fagocitose mediada por receptores Fc, presentes na superfície de macrófagos, requer que os parasitos tenham anticorpos distribuídos de maneira homogênea em sua superfície. Sendo assim, parasitos que apresentam perfis de “capping” não seriam ingeridos. O “shedding” de proteínas de superfície pode ser bastante importante na patogênese de diversas doenças (DELLA SBARBA & ROVIDA, 2002). Estudos mostraram tanto o “capping” como o “shedding” em *Entamoeba histolytica* (CALDERÓN ET AL., 1980; GUILLÉN et al., 1998) e em tripanosomatídeos patogênicos como *T. cruzi* (SZARFMAN et al., 1980, GONÇALVES et al., 1991, TORRES, 2006) e *Leishmania amazonensis* (SARAIVA et al., 1989).

### 1.3. Mecanismo de “Shedding”

O “shedding”, por definição, é a liberação de constituintes da superfície celular na forma solúvel ou associado a vesículas sem afetar a viabilidade celular (TARABOLETTI et al., 2002). O “shedding” de vesículas, também denominado esfoliação, foi descrito por Vitteta & Uhr (1972), que estudaram a liberação de imunoglobulinas em linfócitos murinos de baço. A liberação de constituintes solúveis depende da atividade proteolítica, que cliva ectodomínios das proteínas transmembrana, enquanto que as vesículas são liberadas a partir da membrana plasmática. Com exceção da proteólise, a maioria dos processos de “shedding” pode requerer que as moléculas que irão ser liberadas possuam alguma mobilidade no plano da membrana plasmática (DOETSCHMAN, 1980).

#### 1.3.1. “Shedding” de ectodomínios

O “shedding” de ectodomínios é uma modificação pós-translacional irreversível de proteínas transmembrana, que ocorre pela ação de endoproteases (“shedases”, ou secretases ou convertases), resultando na liberação (“shedding”) de uma grande porção, freqüentemente, toda a porção extracelular (ectodomínio) das proteínas (DELLA SBARBA & ROVIDA, 2002). O “shedding” de ectodomínios representa uma estratégia importante e eficiente para a regulação da atividade de diferentes moléculas regulatórias, como receptor-ligante, moléculas de adesão e ectoenzimas (WERB & YAN, 1998, DELLA SBARBA & RODOVIDA, 2002). A clivagem proteolítica dos domínios extracelulares de proteínas transmembrana permite que as células alterem rapidamente a composição da superfície celular e liberem mediadores solúveis, que atuam em células vizinhas (GUTWEIN et al., 2002). Este processo é denominado de “down-modulation” ou “trans-modulation” e é independente da presença de um ligante ou de um receptor funcionalmente ativo (DOWNING et al., 1989). Uma das maneiras pela quais o

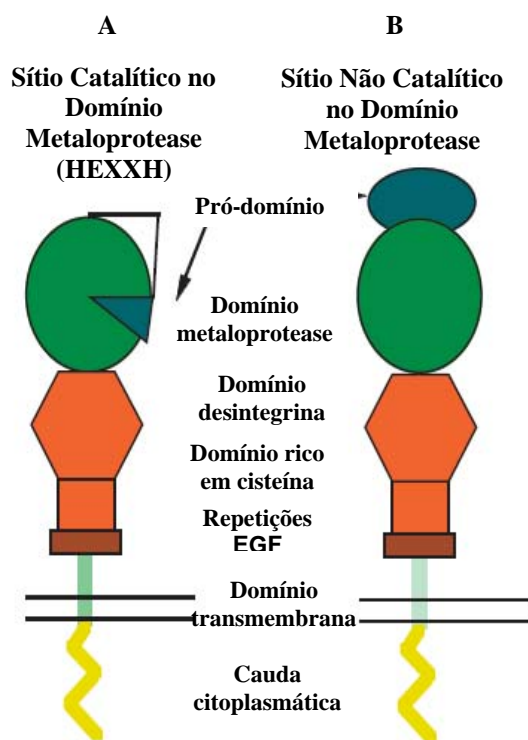
“shedding” de proteínas transmembranas parece ocorrer é através da clivagem de seqüências de aminoácidos, ainda pouco caracterizadas, localizadas entre o domínio extracelular e a região transmembrana, bem próxima à superfície celular (EHLERS et al., 1996).

Os ectodomínios liberados podem ter diversas funções biológicas, por exemplo: **(a)** a “down-modulation” na superfície celular, resultando numa inibição direta da interação receptor-ligante e uma conseqüente alteração dos efeitos regulatórios e/ou adesivos de moléculas exibidas na célula; **(b)** a geração de receptores solúveis, que poderão competir com seus próprios ligantes, alterando a concentração efetiva de ligante na célula; **(c)** ou ainda a geração de porções transmembrana/citoplasmáticas das moléculas, que podem ter funções de sinalização diferente das moléculas originais (DELLA SBARBA & ROVIDA, 2002).

Com relação à liberação de componentes de membrana, duas classes de metaloproteinases estão relacionadas com shedding de ectodomínios: membros da família das desintegrinas / metaloproteases (ADAMs – “**a disintegrin and metalloproteases**”) e metaloproteases da matriz (MMPs – “**matrix metalloproteases**”). As ADAMs são proteínas de membrana caracterizadas por um domínio conservado, que consiste de uma seqüência sinal N-terminal seguida por um pró-domínio, a metaloprotease, e domínios de desintegrina, uma região rica em cisteína, freqüentemente contendo uma repetição do fator de crescimento epidermal, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (BLACK & WHITE, 1998, SCHLÖNDORFF & BLOBEL, 1999) (**Fig. 3- A e B**). Em ambas as classes de proteases, o pró-domínio desempenha um papel crucial na regulação da atividade proteolítica. A ADAM17/TACE medeia a liberação de TNF- $\alpha$ , L-selectina e TGF- $\alpha$  (PESCHON et al., 1998). ADAM10/KUZ é uma  $\alpha$ -secretases para a clivagem do APP (Proteína Percursora Amielóide) (LAMMICH et al., 1999). ADAM9 (IZUMI et al., 1998) e ADAM10 (LEMJABBAR & BASBAUM, 2002) estão envolvidas no “shedding” do ectodomínio de fator de crescimento epidermal ligante de heparina, ancorada à membrana.

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são produzidas por diferentes tipos celulares como lipócitos, células sinusoidais e células de Kupffer, e atuam modificando ou degradando a matriz extracelular das células eucarióticas e desempenham um papel na modelagem de tecidos normais e diferenciação durante o desenvolvimento. Sua síntese e secreção parecem ser importantes nos processos fisiológicos, incluindo respostas inflamatórias, morfogênese, invasão tumoral e patogênese em muitas doenças. Kajita e col. (2001) demonstraram que MT1-MMP podem clivar CD44, o receptor celular mais importante para ácido hialurônico. Outras MMPs podem clivar moléculas da superfície celular como, por exemplo, receptores de quimiocina e Fas ligantes (EGEBLAD & WERB, 2002, OSENKOWSKI et al., 2004).

A liberação de proteínas solúveis, através do “shedding” de ectodomínios, é a consequência de duas vias compartilhadas, um mecanismo de sinalização intracelular envolvendo a proteína quinase C (KIESSLING & GORDON, 1998) e um outro mecanismo independente dessa via, tais como a clivagem proteolítica mediada por metaloproteases, dependentes de zinco (SCHLÖNDORFF & BLOBEL, 1999), tirosinas cinases do tipo citoplasmática (CTK) (INGLEY, 2008), proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (MONTERO et al., 2002), proteína cinase A (PKA) (ISLAM et al., 2008), fosfolipase A (PLA) (MONTESEIRÍN et al., 2005), fosfolipase C (GRUSZYNSKI et al., 2003, PARKIN et al., 2003) e calmodulina (ANNABI et al., 2001).



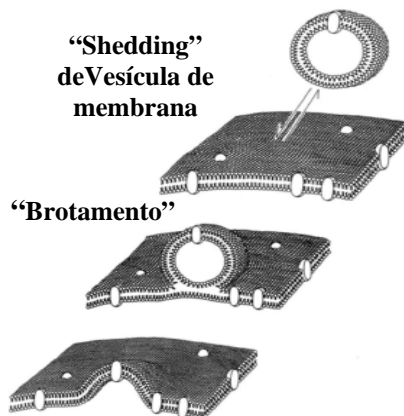
**Figura 3-** Organização do domínio desintegrina-metaloprotease (ADAMS). Dois modelos de organização de domínios das ADAMs ancoradas na membrana. (A) O sítio catalítico está no domínio metaloprotease e em B a ADAM não possui um sítio catalítico em seu domínio metaloprotease. De uma forma geral, as ADAMs ancoradas na membrana possuem uma seqüência N-terminal, um pró-domínio, no qual segue-se o domínio metaloprotease (com ou sem o sítio catalítico), domínio desintegrina, uma região rica em cisteína, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (SCHLÖNDORFF & BLOBEL, 1999).

### 1.3.2. “Shedding” de vesículas de membrana

O “shedding” de vesículas de membrana é um fenômeno comum em células tumorais (CASSARA et al., 1998, DOLO et al., 1994) e em algumas células normais (DAINIAK, 1991). Tais processos podem ocorrer tanto *in vivo* como *in vitro*. Esse processo parece ser um importante mecanismo para interação célula-célula e célula-matriz (CASSARA et al., 1998).

As vesículas de “shedding” são liberadas no meio extracelular como consequência de eventos de brotamento (PILZER et al., 2005). O isolamento dessas vesículas demonstrou que as mesmas derivavam de domínios de membrana ricos em proteínas, dentre elas enzimas

proteolíticas (LIOTTA *et al.*, 1977; GINESTRA *et al.*, 1997; CASSARA ET AL., 1998), com baixos conteúdos de fosfolipídios e uma grande quantidade de colesterol e esfingomielina, denominadas plataformas lipídicas (“lipid rafts”) (VAN BLITTERSWIJK *et al.*, 1982, CASSARA *et al.*, 1998) (Fig. 4). As plataformas de membrana são resistentes à solubilização por detergentes e estão envolvidas em várias funções celulares, como sinalização celular, endereçamento molecular e tráfego de membranas (SIMONS & IKONEN, 1997; LAFONT *et al.*, 1999).



**Figura 4-** Liberação de vesículas de membrana. A esfoliação (shedding) da membrana plasmática permite a liberação de vesículas para o meio extracelular. Modificado de Pilzer *et al.* (2005) e Dainiak, (1991).

Os mecanismos de sinalização envolvidos no “shedding” de vesículas ainda não estão totalmente elucidados (COLTEL, 2006). Entretanto, alguns desses já foram descritos como importantes para eventos de brotamento de vesículas oriundas da membrana plasmática, como a participação de íons de cálcio (SHUKLA *et al.*, 1978; MORGAN, 1985, 1987; COMFURIUS *et al.*, 1990, CARAFOLI, 1994; RATAJCZAK *et al.*, 2006; MOSKOVICH & FISHELSON, 2007), cinases (CYBULSKY *et al.*, 1990; KRAUSS & FISHELSON, 2000; KRAUS, SEGER & FISHELSON, 2001; revisto em PILZER *et al.*, 2005; revisto em COLTEL *et al.*, 2006) e proteases (WIEDMER *et al.*, 1990; FOX *et al.*, 1990, 1991). Mais recentemente, foi demonstrado que o ATP, via seu receptor  $P_2X_7$ , pode ativar uma esfingomielinase ácida, provocando a liberação de vesículas da membrana de astrócitos em um processo dependente de p38 MAPK (BIANCO *et al.*, 2009).

#### **1.4. Modulação de componentes de superfície em *Trypanosomatídeos***

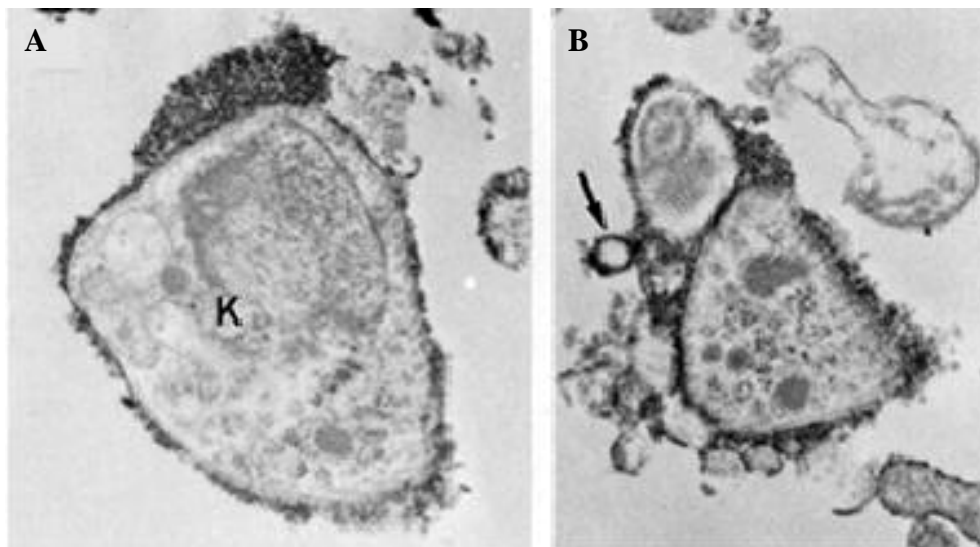
Devido à fluidez da membrana plasmática, alguns componentes de superfície sofrem difusão lateral no plano da membrana, na presença de substâncias que são responsáveis por essa mobilidade, como anticorpos e lectinas, devido principalmente à presença de dois ou mais sítios de ligação dessas moléculas com a superfície celular, facilitando o processo de aglutinação. Além dessas, foi descrita a participação da ferritina cationizada na formação de

agregados de sítios aniônicos em linfócitos (BUTMAN et al., 1980) e em plaquetas humanas (BEHNKE, 1987). Tais mudanças nos componentes da membrana permitem a formação de agregados pontuais (“patches”) e total (“caps”) e podem ser subsequentemente endocitados, o que permite a renovação das proteínas da membrana plasmática ou liberados no meio extracelular.

Dentre os protozoários, a *Entamoeba histolytica* é tida como um modelo para a descrição dos processos de “capping” e “shedding”. Há uma intensa movimentação de componentes da membrana plasmática de trofozoítos de *E. histolytica* na presença de anticorpos e Con A, que está sob influência do citoesqueleto celular (PINTO DA SILVA ET AL., 1975; GITLER ET AL., 1984; ESPINOSA-CARTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 1994).

O “capping” em tripanossomatídeos já foi observado *in vitro* em diferentes formas de desenvolvimento pertencentes aos gêneros patogênicos da família Trypanosomatidae. No gênero *Leishmania*, Doyle e col. (1974) mostraram o “capping” de imunocomplexos, quando formas promastigotas de *L. enriettii* foram incubadas com anticorpo de cobaias infectadas e tais moléculas induziram a formação de agregados de antígenos de superfície. Esse processo se mostrou dependente de temperatura e energia. Em *L. amazonensis*, a incubação com ferritina cationizada induziu o “capping” e o “shedding” de sítios aniônicos desse parasito. Esse processo foi inibido por azida sódica, mas não à baixa temperatura (4°C) (SARAIVA et al., 1989). Em *T. brucei*, foi demonstrado o “capping” e o “shedding” de glicoproteínas de variação antigênica (VSG) da forma tripomastigota sanguínea (BARRY, 1979; OVERATH & ENGSTLER, 2004; SEYFANG et al., 1990).

Em *T. cruzi*, foi demonstrada a movimentação de componentes de membrana das formas tripomastigotas sanguíneas, quando incubadas na presença de soro obtido de pacientes chagásicos ou de camundongos infectados (SCHUMUÑIZ et al., 1978, 1980). Observou-se que este processo era dependente de energia e de temperatura e que variava de acordo com a cepa do parasito utilizada. Enquanto o “capping” é facilmente obtido com parasitos da cepa Y é difícil induzir tal processo nas formas tripomastigotas da cepa CL. O tratamento com citocalasina B ou colchicina, por sua vez, não interferiu na formação desses agregados, indicando uma participação pouco expressiva do citoesqueleto na movimentação de moléculas da superfície (SCHUMUÑIZ et al., 1978, 1980) (Fig.5 –A e B). O “capping” na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi* também foi observado em experimentos realizados em presença de Con A (SZARFMAN et al., 1980).



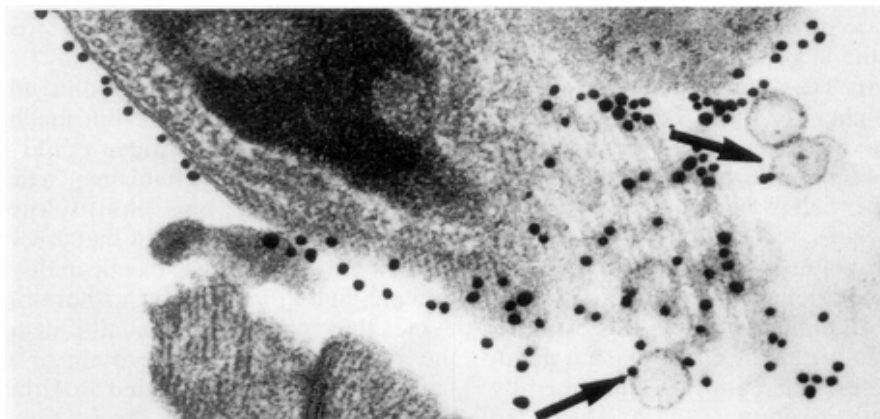
**Figura 5:** Dinâmica dos antígenos de superfície das formas tripomastigotas da cepa Y na presença de soro de paciente chagásico. Tripomastigotas incubados com soro e incubados a 0°C por 30 minutos e a seguir por mais 15 minutos a 37°C. Segue-se incubação com Igs anti-humanas conjugadas com peroxidase, e a seguir re-incubadas a 37°C por 30 minutos. A marcação com peroxidase mostra em (A) a formação de “capping” e em B a liberação (“shedding”) de vesículas de membrana (seta) recobertas pela peroxidase. (SCHMUÑIZ *et al.*, 1980).

No *T. cruzi* o “capping” dos antígenos de superfície pode levar ao “shedding” do complexo antígeno-anticorpo, explicando, desta maneira, a presença de antígenos circulantes (exoantígenos) no soro, nos rins e na urina de animais infectados e de pacientes nas fases aguda e crônica da doença de Chagas (DZBÉNSKI, 1974; CASTRO & RIBEIRO DOS SANTOS, 1977; DE SIQUEIRA *et al.*, 1979; SCHUMUÑIZ *et al.*, 1980; ARAÚJO, 1981; BONGERTZ *et al.*, 1981; ARAÚJO *et al.*, 1987). A ocorrência de antígenos do parasito em tecidos e órgãos nos quais parasitas intracelulares não são visualizados ou sobre células não infectadas foi descrito na fase crônica da doença de Chagas e isso pode explicar o aumento no número e no tamanho das lesões inflamatórias observadas (RIBEIRO DOS SANTOS & HUDSON, 1980; BEN YOUNES-CHENNOUFI *et al.*, 1988).

Estudos prévios mostraram que antígenos de superfície do *T. cruzi* são constitutivamente eliminados da superfície do parasito através de “shedding”, envolvendo a formação de vesículas da membrana plasmática (GONÇALVES *et al.*, 1991). Os autores mostraram também que as vesículas possuíam de 20 a 80 nm de diâmetro e que a análise por SDS-PAGE mostrava diversas proteínas, dentre elas um antígeno de superfície de 85 kDa, TC85, envolvido no processo de interação com células hospedeiras, cujo “shedding” era inibido na presença de inibidores da glicosilação do tipo N (GONÇALVES *et al.*, 1991; ABUIN *et*



*al.*, 1996) (**Fig. 6**). Além dessa proteína, um antígeno específico do *T. cruzi* também foi observado associado à vesículas (OUAISSI *et al.*, 1992)



**Figura 6:** Localização imunocitoquímica do antígeno TC-85 em formas tripomastigotas de *T. cruzi* pertencentes à cepa YuYu. As células foram pré-fixadas e então marcadas com o anticorpo monoclonal anti-TC85 (H1A10) e subsequentemente incubadas na presença de anticorpo anti IgG de camundongo complexada com partículas de ouro coloidal. As vesículas que são liberadas apresentam o antígeno em questão (GONÇALVES *et al.*, 1991).

Além das proteínas que estão associadas a vesículas, existem aquelas que são liberadas na forma solúvel como o T-DAF, o antígeno SAPA, o Ssp-4, principal antígeno da superfície de amastigotas, além de alguns membros da família *trans*-sialidades (JOINTER *et al.*, 1988; ANDREWS *et al.*, 1988; DE TITTO & ARAÚJO, 1988; AFFRANCHINO *et al.*, 1989; CAMPETELLA *et al.*, 1992; FREVERT *et al.*, 1992). Estudos também demonstraram que algumas proteínas podem ser liberadas através da clivagem de âncoras de GPI, devido à ação de fosfolipase C (MORTARA *et al.*, 2001). Além da fosfolipase C, o *T. cruzi* possui outras duas classes de enzimas, uma delas inibida pela o-fenantrolina, presentes nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (SCHENKMAN *et al.*, 1988).

#### 1.4.1. Proteases em tripanossomatídeos

As proteases são enzimas hidrolíticas capazes de clivar ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas (BARRET, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001). Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com: **a)** o tipo de reação catalisada, sendo exoproteases e endopeptidases. As exopeptidases atuam na porção amino-terminal, liberando um resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo ou na porção carboxi-terminal, liberando um resíduo de aminoácido ou um dipeptídeo. As endopeptidases são aquelas enzimas que clivam

ligações peptídicas internas da cadeia polipeptídica.; **b**) a natureza química do sítio catalítico, dividindo as endoproteases em subclasses do tipo serina, cisteína, aspártico, treonina, glutâmico peptidase e metaloproteases, devido à presença de um resíduo de serina, cisteína, dois ácidos aspárticos, treonina, ácido glutâmico, e um íon, normalmente o  $Zn^{2+}$ , no sítio ativo da enzima, respectivamente (BARRET, 1994; BARRET, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001).

Nos tripanossomatídeos, já foram detectadas metalo, cisteína, (BRANQUINHA *et al.*, 1996), serina-proteases e aspártico peptidases (ITOW & CAMARGO, 1977; CAMARGO, ITOW & ALFIERI, 1978, NORTH, COOMBS & BARRY, 1983; ASHALL, 1990; VALDIVIESO, DAGGER & RASCÓN, 2007). Estas enzimas têm se mostrado importantes na interação parasito-hospedeiro, participando na invasão da célula hospedeira, escape ou modulação do sistema imunológico, por degradação ou inativação de moléculas do sistema imune do hospedeiro, remodelagem do parasito durante a diferenciação celular, dentre outras funções (McKERROW *et al.*, 1993).

No *T. cruzi*, a principal cisteína proteinase detectada é uma glicoproteína monomérica de 60 kDa, altamente imunogênica denominada gp57/51 ou cruzipaína (MURTA *et al.*, 1990). A cruzipaína está presente em todas as cepas e clones até hoje testados, assim como em todas as formas de desenvolvimento deste tripanossomatídeo, com os maiores níveis detectados na forma epimastigota (TOMAS & KELLY, 1996), estando associada principalmente ao sistema endocítico/lisossomal e reservossomas em epimastigotas (MURTA *et al.*, 1990; SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990, SOARES, SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1992). Pode também estar presente na superfície de amastigotas e epimastigotas e na bolsa flagelar das três formas de desenvolvimento (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990). Dentre as várias funções associadas a essa protease, sabe-se que a cruzipaína está relacionada com a degradação protéica, metacicloênese (BONALDO *et al.*, 1991; TOMAS, MILES & KELLY, 1997), multiplicação do parasito nas células do hospedeiro (MEIRELLES *et al.*, 1992) e provavelmente no escape do sistema imune (GRUPPI, CERBÁN & VOTTER-CIMA, 1997) e invasão (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; APARÍCIO *et al.*, 2004).

Dados prévios sugerem que a cruzipaína seja secretada para o meio externo onde atuaria sobre um precursor peptídico, associado ao parasito, presente, provavelmente, em membranas liberadas pelo mecanismo de “shedding” (APARÍCIO *et al.*, 2004).

Além da cruzipaína, foi também descrita no *T. cruzi* uma cisteína-proteinase de 30kDa (GARCIA *et al.*, 1998; NÓBREGA *et al.*, 1998), sendo sua função ainda pouco conhecida, além de proteínas da família das calpaínas (cisteína proteinase dependente de cálcio). Calpaínas descritas em *Leishmania donovani*, foram denominadas caldonopaína (BHATTACHARYA, DEY & DATTA, 1993). D'AVILA-LEVY e cols. (2006) mostraram, em *L. amazonensis*, que a inibição de calpaínas III pelo seu inibidor MDL28170 promoveu alterações no crescimento celular.

Recentemente, observou-se em formas epimastigotas do *T. cruzi* a ligação de anticorpos anti-calpaina de *Drosophila melanogaster* em estruturas no citoplasma do parasito (SANGENITO *et al.*, 2009).

No *T. cruzi*, não apenas a cruzipaina está relacionada com os processos de invasão e infectividade, sendo essas propriedades também atribuídas, tanto nesse protozoário como em outros tripanossomatídeos, às metaloproteases.

No gênero *Leishmania*, as formas promastigotas das espécies patogênicas ao homem expressam em abundância uma glicoproteína de superfície de 60-65 kDa, ancorada à membrana por uma âncora de GPI, com atividade de metaloproteinase, denominada gp63 ou leishmaniolisina ou protease de superfície das formas promastigotas (PSP), ou protease de superfície majoritária (MSP) (ETGES *et al.*, 1986; BORDIER *et al.*, 1986, 1987; MEDINA-ACOSTA *et al.*, 1993; SCHLAGENHAUF *et al.*, 1998), a qual é distribuída por toda a superfície celular das formas promastigotas, incluindo o flagelo (FONG & CHANG, 1982; YAO *et al.*, 2003). Essa metaloprotease majoritária, além de estar ancorada na superfície celular das formas promastigotas do gênero *Leishmania*, já foi detectada no meio extracelular, associada à vesículas de membrana e na forma solúvel (JAFLE & DWYER, 2003; revisto em SANTOS, BRANQUINHA & D'AVILA-LEVY, 2006). Interessantemente, demonstrou-se que a liberação da gp63 parece ser dependente da sua autoproteólise (McGWIRE *et al.*, 2002).

No *T. cruzi*, foi identificada uma família de genes *gp63* constituída de múltiplos grupos, cuja inibição por ligação com anticorpos específicos bloqueia parcialmente a infecção de células Vero, sugerindo uma possível função desta metaloprotease no processo de infecção *in vitro* (CUEVAS *et al.*, 2003). Recentemente, essa *gp63* "like" de *T. cruzi* foi identificada em todas as formas de desenvolvimento do parasito (KULKARNI *et al.*, 2009).

Outras metaloproteases na faixa de 50 a 70 kDa, também foram identificadas no *T. cruzi*, associadas à sua membrana (BONALDO *et al.*, 1991; LOWNDES ET AL., 1996). A expressão de metaloproteases é considerada quantitativamente e qualitativamente heterogênea entre as cepas e as formas de desenvolvimento do *T. cruzi* (LOWNDES *et al.*, 1995).

Como já mencionado, as serina proteases também são encontradas em tripanossomatídeos, em várias cepas do *T. cruzi* (ITOW & CAMARGO, 1977) e nos gêneros *Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (CAMARGO, ITOW & ALFIERI, 1978; NORTH, COOMBS & BARRY, 1983, ASHALL 1990). De uma forma geral, essas enzimas em tripanossomatídeos apresentam um alto peso molecular e são consideradas enzimas citoplasmáticas (LOWNDES *et al.*, 1990). As serina oligopeptidases do grupo das prolil peptidases clivam, na sua maioria, peptídeos após resíduos de prolina. Um subgrupo menor dessa família cliva substratos no lado carboxil de resíduos de aminoácido básicos sendo

denominada de serina oligopeptidase B. Esse subgrupo foi identificado em *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania*.

No *T. cruzi*, detectou-se uma serina proteinase de 120 kDa, pertencente à família das prolil oligopeptidases de serina hidrolases, no citosol de formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*, estando envolvida na interação parasito-hospedeiro (revisto por BURLEIGH & WOOLSEY, 2002). Foi verificado, também, que o *T. cruzi* secreta uma serina-proteinase de 250 kDa, que parece ser importante para o mecanismo de adaptação durante o seu ciclo de vida, além de ser altamente antigênica (MARTINS *et al.*, 1994).

Ainda com relação às serina proteinases, também foi demonstrado que as formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas do *T. cruzi* secretam uma prolil-oligopeptidase não-lisossomal de 80 kDa (POP Tc80), com alta especificidade para colágeno humano tipos I e IV, sugerindo que esta enzima pode facilitar a disseminação da doença de Chagas (SANTANA *et al.*, 1997; JOYEAU *et al.*, 2000; GRELLIER *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2005).

Embora mecanismos que provocam a liberação de componentes da superfície celular já sejam conhecidos no *T. cruzi* (JOINTER *et al.*, 1988; ANDREWS *et al.*, 1988; DE TITTO & ARAÚJO, 1988; AFFRANCHINO *et al.*, 1989; CAMPETELLA *et al.*, 1992; FREVERT *et al.*, 1992; GONÇALVES *et al.*, 1991; OUAISSI *et al.*, 1992), não se sabe a real contribuição de cada um deles na modulação da superfície do parasito, como também não se conhece se os mesmos mecanismos são utilizados por diferentes cepas.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. *Objetivo geral*

Este trabalho visa analisar qualitativa e quantitativamente o processo de liberação de componentes da superfície celular (“shedding”) nas formas tripomastigotas do *T. cruzi*, identificando a contribuição do “shedding” de ectodomínios e do “shedding” de vesículas na modulação da superfície do parasita.

### 2.2. *Objetivos específicos*

- Analisar, por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura, a localização dos sítios de ligação para a FC e a ConA em parasitos vivos.
- Analisar quantitativamente, por citometria de fluxo, a modulação dos sítios de ligação de Concanavalina A.
- Analisar o material liberado pelo parasito quanto à quantidade e perfil de proteínas liberadas, e atividade proteolítica.
- Observar vesículas liberadas no meio de cultivo, por microscopia eletrônica de transmissão
- Analisar a influência de PKC no processo de “shedding”.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1. Parasitos

Foram utilizadas as formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes à cepa Y, isolada de um caso agudo humano de doença de Chagas (SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) e ao clone CL-Brener (ZINGALES *et al.*, 1977). Tripomastigotas de cultivo celular foram obtidos do sobrenadante de células LLC-MK<sub>2</sub> previamente infectadas. O sobrenadante das células contendo os parasitos, foi coletado e centrifugado a  $500 \times g$  durante 5 minutos. Esta etapa separa os restos celulares e as formas amastigotas, que ficaram no sedimento, das formas tripomastigotas, que permaneceram no sobrenadante. Como uma quantidade significativa de tripomastigotas ficou retida no sedimento, o tubo contendo a amostra foi incubado a 37°C por 2-3 h, para que esses tripomastigotas saíssem do sedimento e retornassem ao sobrenadante. O sobrenadante foi, então, coletado e centrifugado a  $2000 \times g$  durante 12 minutos, para obtenção dos tripomastigotas puros.

#### 3.2. Cultivo de células hospedeiras

As células LLC-MK<sub>2</sub> foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção dessas células foi realizada através de repiques. Para o repique das células, o meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino foi retirado e as garrafas de culturas foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e incubadas com solução de Tripsina-Verseno durante 1 minuto. A seguir, esse líquido contendo a tripsina foi removido e as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 acrescido com 10% de soro fetal bovino, para que se soltassem da garrafa. Uma vez soltas, as células foram transferidas para novas garrafas de cultura.

#### 3.3. Infecção de células hospedeiras

Células LLC-MK<sub>2</sub> foram infectadas 24 h após o repique, quando as culturas ainda não se encontravam totalmente confluentes. A infecção foi feita tendo 10:1 como relação parasito-hospedeiro. Os parasitos ficaram em contato com as células por 24 horas. Após este tempo, os parasitos foram removidos e, então, as células infectadas foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As

células infectadas foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> pelo tempo necessário para a conclusão do ciclo intracelular do parasito que é de aproximadamente 5 e 10 dias para a cepa Y e para o clone CL-Brener, respectivamente. Após a liberação das formas tripomastigotas, as garrafas de cultura foram mantidas em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***3.4. Efeito de Ferritina Cationizada (FC) e da lectina Concanavalina A (ConA) na movimentação e “shedding” de componentes de superfície.***

Tripomastigotas ( $2 \times 10^7$  parasitos/ml), obtidos de meio de cultura, foram lavados em meio RPMI sem soro e incubados no mesmo meio, contendo 10 µg/ml de FC ou do complexo ConA-ouro coloidal (8-10 nm de diâmetro), por 30 minutos a 4°C e então centrifugadas a 20.000 x g a 4°C. Uma alíquota foi imediatamente fixada em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com cloreto de cálcio 5mM e 3,7 % de sacarose por 1 h a temperatura ambiente. Duas outras amostras foram lavadas 1 vez com RPMI sem soro a 4°C para remoção da ferritina não ligada ao parasito e incubadas por mais 30 minutos nesse mesmo meio e na mesma temperatura (“shedding a 4°C”). Após este período, uma das amostras foi centrifugada a 4°C e fixada e a outra amostra foi, então, incubada a 37°C por mais 30 min (“shedding” a 37°C). Após esta incubação, a amostra foi fixada como citado acima. Para servir como controle do efeito da FC e da ConA sobre movimentação de sítios de superfície nos parasitos vivos, uma parte da mesma amostra de tripomastigotas foi pré-fixada em solução de glutaraldeído 1 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com cloreto de cálcio 5mM e 3,7 % de sacarose por 10 min a temperatura ambiente, lavada 2 vezes em PBS, incubada durante 30 min na presença de 10 µg/ml de FC e ConA em PBS a temperatura ambiente, lavada 2 vezes em PBS e re-fixada em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com cloreto de cálcio 5mM e 3,7 % de sacarose por 1 h a temperatura ambiente. As amostras foram processadas para análise por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, conforme será descrito mais adiante.

Amostras foram também incubadas na presença do conjugado ConA fluorescente (ConA-FITC, 10 µg/ml), seguindo os mesmos procedimentos descritos acima. A única modificação feita foi o tipo de fixador utilizado, que foi a formalina 3,7% em PBS. Após a fixação, as células foram processadas para análise por citometria de fluxo, conforme será descrito no item 3.13.

### **3.5. Ensaio de lise pelo anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal**

Para avaliar o efeito lítico do anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal sobre as formas tripomastigotas realizamos os experimentos conforme descrito anteriormente por Pereira-Chioccola e col. (2000). Formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener (4  $\mu$ l em meio RPMI sem SFB;  $1 \times 10^7$  parasitos/ml) foram pré-tratadas por 10 minutos a 37°C com 10  $\mu$ g/ml FC ou Con A, ou somente com meio de cultura. A seguir, foram adicionados 8  $\mu$ l do anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal (20  $\mu$ g/ml) e a mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Foram contados em câmara de Neubauer o número de tripomastigotas móveis e livres (não aglutinados). Os resultados foram expressos em porcentagem (média  $\pm$  desvio padrão) de parasitos móveis e livres, comparados com o controle. Experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.6. Ensaio de “Shedding”**

Os ensaios que realizamos são relativos à análise das moléculas liberadas no meio de cultivo pelas formas tripomastigotas. Como essas formas possuem uma baixa atividade endocítica e exocítica (revisado em CLAYTON, HÄUSLER & BLATTNER, 1995; McCONVILLE *et al.*, 2002; DE SOUZA, SANT’ANNA & CUNHA-E-SILVA, 2009), inferimos que a liberação de moléculas se faz majoritariamente através do mecanismo de “shedding”. Como são descritas pelo menos duas formas de “shedding”, o “shedding” de ecto-domínios e o “shedding” de vesículas, analisamos esses dois tipos de material, conforme será descrito mais adiante. O ensaio de “shedding” mais geral possibilita a obtenção dos dois tipos de material liberado. Para isto, tripomastigotas purificados, obtidos como descrito no item 3.1, foram lavados em solução salina balanceada de Hank (HBSS) sem soro e incubados em tubos Ependorff por 3 h a 37°C em HBSS sem soro. Cada tubo contém no mínimo  $2 \times 10^7$  parasitos/ml e após este tempo os tubos foram centrifugados a  $13.000 \times g$  por 4 min e os parasitos e o sobrenadante foram recolhidos para posterior análise. A contagem dos parasitos foi feita em câmara de Neubauer, após fixação em formalina 10% em PBS (líquido de contagem).

#### **3.6.1. Avaliação da viabilidade dos parasitos após o ensaio de “shedding”**

Todos os ensaios realizados com os parasitos foram acompanhados pela verificação da viabilidade, através do teste de exclusão do corante azul de Trypan (PATTERSON, 1979). Em



todos os experimentos analisados o percentual de lise foi menor de 10%, tanto para a cepa Y quando para o clone CL-Brener.

### *3.6.2. Isolamento das vesículas de membrana liberadas no meio de cultivo (vesículas de “shedding”)*

Sabe-se que componentes da superfície do *T. cruzi* são constitutivamente eliminados da superfície do parasito, através de “shedding”, envolvendo a formação de vesículas da membrana plasmática (GONÇALVES et al., 1991; OUAISSI et al., 1992). Com intuito de verificar o tamanho e a forma das vesículas liberadas no meio de cultivo pelas formas tripomastigotas do *T. cruzi*, o sobrenadante, obtido como descrito no item 3.6, foi centrifugado a  $100.000 \times g$  por 1 h a 4°C em ultracentrífuga Beckman, utilizando o rotor SW 50. Após esse tempo, o sedimento foi ressuspensão em PBS pH 7.2 e analisado por microscopia eletrônica de transmissão.

### *3.7. Avaliação de componentes liberados pelos tripomastigotas no meio de cultura*

Com o objetivo de identificar e comparar os componentes liberados pelas formas tripomastigotas, pertencentes a cepa Y e ao clone CL-Brener do *T. cruzi*, analisamos o perfil protéico e proteolítico do sobrenadante obtido, após ensaio de “shedding” dos parasitos pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener, como descrito no item 3.6.

#### *3.7.1. Análise quantitativa das proteínas liberadas no meio de incubação*

O sobrenadante total obtido como descrito no item 3.6. foi dosado, segundo o método de Bradford (1951), utilizando solução de albumina (BSA) na concentração de 1 mg/ml para construção da curva-padrão e 50 µl de uma solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Coomassie Blue-G a 0,025%, etanol a 11,75% e ácido fosfórico a 21,25%) e 50 µl de PBS pH 7.2. A leitura foi realizada, após 10 min de contato dos sistemas reacionais com o corante, em leitor de ELISA em 595 nm de comprimento de onda. Como o nosso trabalho se refere à análise comparativa de duas amostras de *T. cruzi* e em situações nas quais avaliamos células e sobrenadante, utilizamos um total de  $2 \times 10^7$  parasitos/ml e padronizamos a quantidade de proteínas relativas a essa concentração de parasitos.

### *3.7.2. Análise do perfil protéico das diferentes amostras*

Analizamos o perfil protéico dos tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL Brener, dos seus respectivos sobrenadantes totais, obtidos como descrito no item 3.6. Para a análise dos sobrenadantes, os mesmos foram concentrados em Speed Vac<sup>R</sup> plus (SC 110<sup>a</sup> Savant Cover KC110 B) por cerca de 2 horas. O perfil eletroforético protéico foi determinado, segundo protocolo descrito por Laemmli (1970) contendo um gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) e um gel de empacotamento a 3%, utilizando-se de um Mini Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, Calif). As amostras (30 µg/ml) foram diluídas a 1:4 em tampão de amostra 4 X (10% de glicerol, 10% de SDS, 1% de azul de bromofenol, 7% de β-mercaptoetanol em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8) e fervidas por 3 minutos, a 100°C, antes da aplicação no gel. A corrida do gel ocorreu em sistema vertical, com tampão de corrida 1X (0,192 mL de glicina, 0,4% de SDS, Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8). Foi aplicada uma voltagem constante de 100V durante 2 horas à temperatura ambiente. As bandas protéicas foram visualizadas, utilizando-se solução corante contendo 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R em metanol: ácido acético: água destilada (50:10:40 v/v/v) ou com solução de nitrato de prata (GONÇALVES, NEHME & MOREL, 1984). Como descorante foi utilizada uma solução contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético em água destilada. Padrões de massas moleculares conhecidas foram utilizados, aplicando-se 5 µl do marcador de peso molecular Page Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder Plus (Ferramentas Life Science). A aquisição da imagem do gel, a análise densitométrica e massa molecular das bandas protéicas foram realizadas utilizando o aparelho Molecular Imager<sup>R</sup> Gel Doc<sup>TM</sup> equipado com o software Quantity One<sup>R</sup> 1-D.

### *3.7.3. Análise da atividade proteolítica das diferentes amostras*

Analizamos a atividade de cisteíno proteases e metaloproteases presentes nos tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener, nos seus respectivos sobrenadantes totais, obtidos como descrito no item 3.6. As proteases foram caracterizadas por SDS-PAGE a 12,5% (com um gel de empacotamento a 3%), contendo 0,1% de gelatina (Sigma) como substrato co-polimerizado ao gel (HESSEN & DOWDLE, 1980). Aos géis foram aplicados os extratos de tripomastigotas lisados e os sobrenadantes (50 µg/ml) em tampão de amostras 4X (10% de glicerol, 10% de SDS, 1% de azul de bromofenol, em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 em uma diluição de 1:4) utilizando um Mini Protean II (BioRad Laboratories, Richmond, CA). A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical com tampão de corrida 1X (0,192 m de glicina, 0,4% de SDS, Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8), aplicando-se uma

voltagem constante de 120V, a 4°C. Ao término da corrida, os géis foram incubados em 1% Triton X-100 com e sem 10µM de E-64 (inibidor de cisteína proteinase), por 1-2 horas, à temperatura ambiente, com agitação suave. Os géis foram, então, lavados com água destilada e incubados por 48 horas, a 37°C em 50 mM de tampão fosfato, pH 5.5, suplementado com 2 mM de ditioneitol (DTT) (condição que favorece a atividade de cisteína proteinase) ou em tampão 1 M pH 10 (condição que favorece a atividade de metaloprotease), na presença e na ausência dos inibidores proteolíticos citados anteriormente. Depois da digestão enzimática, a revelação das bandas proteolíticas foi feita, primeiramente, através da coloração do gel com 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R em metanol:ácido acético: água destilada (50:10:40 v/v/v) e, finalmente, descorados em solução contendo 7% de metanol e 5% de ácido acético, à temperatura ambiente, com agitação suave, por aproximadamente 16 horas (SANTOS *et al.*, 1999). Padrões de massas moleculares conhecidas foram, utilizados aplicando-se 5 µl do marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas Life Science). A aquisição da imagem do gel, a análise densitométrica e massa molecular das bandas protéicas foram realizadas, utilizando o aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ equipado com o Software Quantity One® 1-D.

### **3.8. Análise da regulação do processo de “shedding”**

A ativação do “shedding” em células de mamíferos possui, pelo menos, dois mecanismos: a ativação de proteínas cinases e a ação de metaloproteases (revisado em DELLA SBARBA & ROVIDA, 2002). Para avaliar a participação da proteína cinase C (PKC) na sinalização do “shedding” em *T. cruzi*, utilizamos o acetato de forbol miristato (PMA), um ativador inespecífico da PKC. Os tripomastigotas ( $2 \times 10^7$  parasitos/ml) foram incubados na presença de PMA (100 ng/ml) durante 1 h a 37°C em meio HBSS. O efeito do mesmo foi avaliado através da dosagem protéica e do perfil de proteínas do sobrenadante total, como descrito em 3.7.1 e 3.7.2. Estas amostras também foram processadas para observação ao microscópio eletrônico de transmissão, conforme será descrito mais adiante.

### **3.9. – Observação das vesículas de “shedding” por contrastação negativa**

Para a análise do tamanho e das formas das vesículas de “shedding”, após isolamento conforme descrito no item 3.6.2., as mesmas foram observadas por contrastação negativa ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni 268. Foi aplicada uma pequena gota, contendo as vesículas, sobre uma grade de cobre de 300 “mesh” previamente coberta com

filme de Formvar e metalizada com carbono. Após 5 minutos, o excesso de líquido foi removido, com o auxílio de um papel de filtro e sobre as amostras adicionados 5 µl de acetato de uranila 2%, diluído em água por 5 minutos. A seguir, com o auxílio do papel de filtro, pela lateral da grade, o excesso do líquido foi removido e aplicados 5 µl de uma solução contendo 2% de metilcelulose e 2% acetato de uranila até o dia seguinte, quando a grade estava seca (adaptado de [POTOLICCHIO et al., 2005](#)).

### ***3.10. Processamento de amostras para imunofluorescência***

Parasitas fixados, obtidos nos diferentes tratamentos, conforme descrito no item 3.5, foram lavados duas vezes em PBS e aderidos em lamínulas previamente cobertas com poli-L-lisina (0,1 % em PBS) por 20 minutos. As lamínulas, contendo os parasitos, foram lavadas com PBS, pH 7,2 e incubadas com 50 mM de cloreto de amônio por 30 minutos em temperatura ambiente. Sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS, contendo 0,2% de gelatina e 0,01% de azida (PGN) por 30 minutos. A seguir, foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo primário Ch anti- $\alpha$ -gal (diluição 1:200) em PGN. Após esse tempo, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas na presença do anticorpo secundário, Alexa-546, conjugada com anticorpo anti-humano diluído em PGN, por 1 h à temperatura ambiente. Posteriormente à marcação, as amostras foram lavadas em PBS e montadas sobre lâminas de vidro, contendo solução de 0,2N de n-propil-galato, diluído em glicerol 90% em PBS e analisadas no microscópio Zeiss Axioplan.

### ***3.11. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)***

As amostras foram lavadas em PBS, e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, contendo 3,7% de sacarose durante 1 hora a temperatura ambiente. Após fixadas, as células em suspensão foram lavadas em PBS e aderidas em lamínulas de vidro, previamente recobertas com poli-L-lisina (0,1% em PBS). Após adesão dos parasitos por 15-20 minutos, as lamínulas foram lavadas por 2 vezes em PBS e pós-fixadas durante 30 minutos em solução de tetróxido de ósmio a 1% em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, com 0,8% de ferrocianeto de potássio e cloreto de cálcio 5 mM. As amostras foram então lavadas em PBS, e desidratadas em séries crescentes de etanol de 15 até 95% e em mais duas etapas em etanol absoluto. Todas as etapas de desidratação foram realizadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico em CO<sub>2</sub> em aparelho BAL-TEC CPD030 e as lamínulas de vidro foram montadas

sobre suportes de alumínio com cola de prata e metalizadas com uma camada de 20 nm de ouro, pelo método de “sputtering”, em aparelho Balzers Union FL-9496. A observação foi feita em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310.

### ***3.12. Processamento de amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET)***

As amostras foram lavadas em PBS e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo 3,7% de sacarose durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes em PBS e pós-fixadas durante 1 hora, em solução de tetróxido de ósmio a 1% em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio e cloreto de cálcio 5 mM. As amostras foram, então, lavadas 2 vezes em PBS e desidratadas em séries crescentes de acetona de 50% até 90% e mais duas vezes em acetona absoluta, 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram, então, infiltradas em resina epoxi Poly-Bed diluída 1:1 em acetona absoluta e, posteriormente, em resina Poly-Bed pura em temperatura ambiente. Após esse período, foi feita a inclusão das amostras em moldes de borracha ou silicone, que permaneceram durante 72 h a 60°C para que a resina fosse polimerizada. Secções ultrafinas foram obtidas em ultramicrótomo Leica UC2 e colhidas em grades de cobre de 300 “mesh”. As grades foram contrastadas em uma solução aquosa de acetato de uranila 5% durante 30 minutos, lavadas em água e, em seguida, incubados em citrato de chumbo durante 5 minutos. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani 268.

### ***3.13. Análise por citometria de fluxo***

Para a avaliação do processo de “shedding” por citometria de fluxo, as formas tripomastigotas ( $5 \times 10^6$  células/ml) da cepa Y e do clone CL-Brener incubadas com ConA-FITC, conforme descrito em 3.4, e cada etapa com os diferentes tipos de incubação foram fixadas, bem como o experimento controle, em formalina 3,7% em PBS pH 7.2. Para avaliar o efeito da FC e de ConA na ligação do anticorpo anti- $\alpha$ -gal, tripomastigotas vivos foram incubados na presença de 10  $\mu$ g/ml de FC e ConA por 30 minutos a 37°C em meio RPMI sem soro fetal bovino ou somente em meio de cultura. Após lavagem, as células foram fixadas em formalina 3,7% em PBS pH 7.2 por 10 min a 4°C. Seguiu-se lavagem em PBS, incubação em solução de cloreto de amônio 50 mM em PBS e em solução de PBS contendo 0,2% de gelatina e 0,01% de azida (PGN). As células foram então incubadas por 1 hora à temperatura ambiente na presença do anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal (diluição 1:200) em PGN. Após lavagem em

PGN as amostras foram incubadas em anticorpo de cabra anti-imunoglobulina humana, conjugado à Alexa Fluor 546 (Molecular Probes), na diluição de 1:500 em PGN. Após processadas, as células destinadas à análise por citometria de fluxo foram diluídas 1:1 em PBS pH 7.2. A obtenção e análises dos resultados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), equipado com o software Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA). Análises posteriores foram realizadas também no software WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, EUA).

## 4. RESULTADOS

---

### 4.1. Mobilidade dos componentes de membrana

Estudos anteriores demonstraram que a ligação da lectina ConA à superfície do *T. cruzi* (SZARFMAN et al., 1980) e de imunoglobulinas de pacientes chagásicos ou de camundongos infectados (SCHUMUÑIZ et al., 1978, 1980) foram capazes de mobilizar componentes de superfície, gerando o “capping” destas moléculas nas regiões anteriores e posteriores do corpo do parasito. Na presença de anticorpos específicos, os parasitos são capazes de descartar o imunocomplexo através da liberação de vesículas ou de um material amorfo eletrondenso, observado por microscopia eletrônica de transmissão (GONÇALVES et al., 1991). Admite-se, por estudos com as diferentes formas, que os epimastigotas possuam uma intensa atividade endocítica/exocítica, o que não parece ser compartilhado pelas formas tripomastigotas e amastigotas (revisado em DE SOUZA, SANT’ANNA & CUNHA-E-SILVA, 2009). A liberação de moléculas no meio por essas duas últimas formas seria dada, majoritariamente, por processos de esfoliação (“shedding”). Baseados nesses resultados prévios existentes, que pouco relataram sobre o(s) mecanismo(s) de indução da liberação dos componentes de membrana do *T. cruzi*, decidimos verificar se a incubação dos parasitos da cepa Y e do clone CL-Brener com a lectina ConA e com a FC era capaz de: 1) induzir a mobilidade dos ligantes para estas substâncias, na ausência de soro; 2) induzir mobilidade dependente de temperatura; 3) em havendo mobilidade, se esta levaria a um processo de “shedding” de componentes da superfície através de vesículas ou não; e 4) em caso de “shedding”, se cinases e proteases participariam deste processo.

Utilizamos células pré-fixadas como controle, para a observação da distribuição dos sítios de ligação de ConA e FC. Os parasitos foram fixados e posteriormente incubados na presença de 10 µg/ml de ferritina cationizada e de ConA. Esta concentração de ConA é muito inferior àquela necessária para a aglutinação de *T. cruzi*, conforme verificado por Pereira e col. (1980).

#### 4.1.1. Comportamento dos sítios ligantes de FC

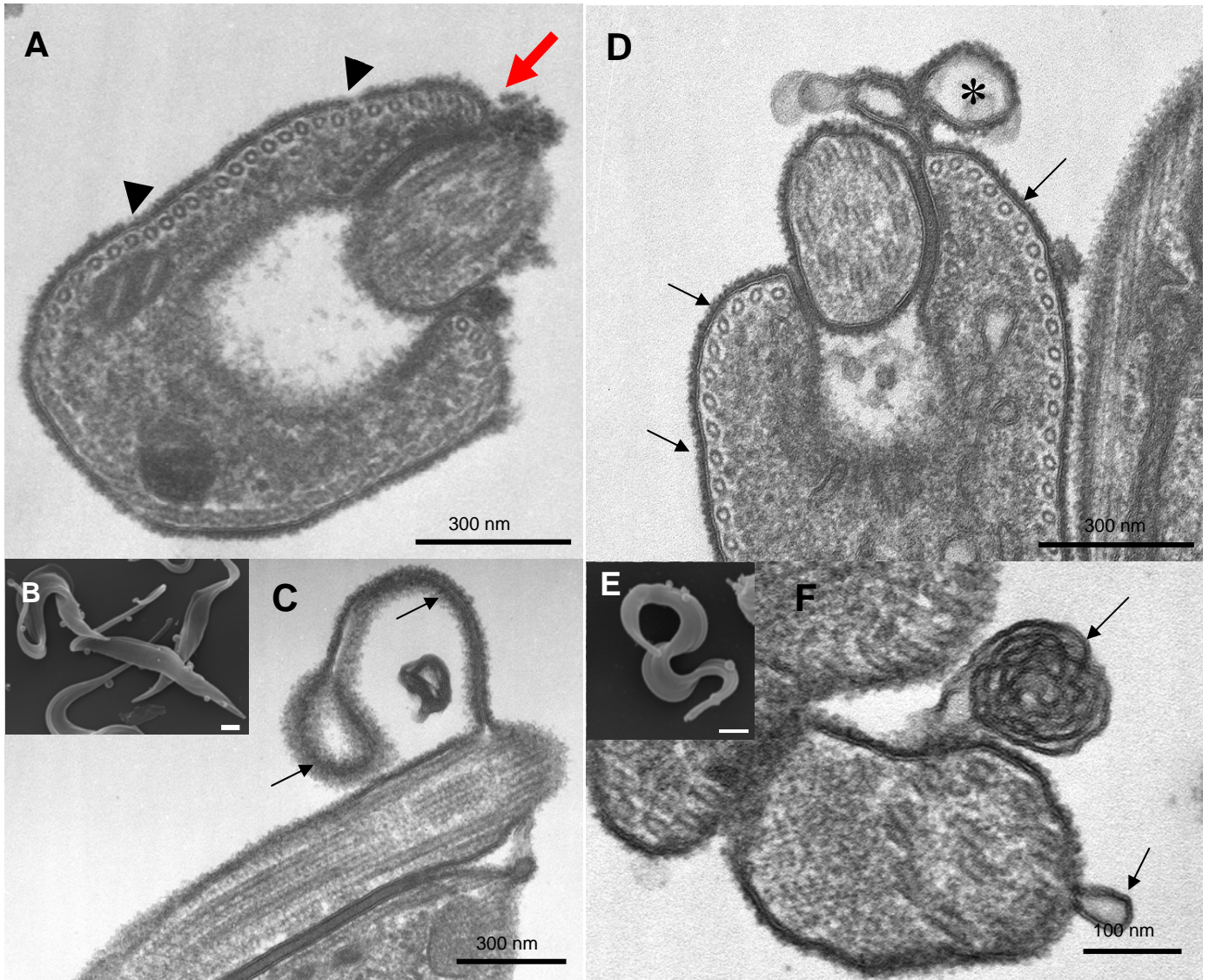
A análise por MET dos parasitos fixados e posteriormente incubados na presença de FC mostrou uma densa camada de partículas de FC no corpo celular e na membrana flagelar. Nas formas tripomastigotas da cepa Y, no entanto, esta camada mostra alguns pontos onde a

quantidade de partículas é menor (**Fig. 7A**), diferentemente do que ocorre no clone CL-Brener (**Fig. 7D**). Em ambos os tripomastigotas, brotamentos de perfis de membrana intensamente marcados com FC foram observados (**Fig. 7C, D**). Entretanto, no clone CL-Brener, também se observa membranas não marcadas brotando da membrana flagelar (**Fig. 7F**). Além disso, observa-se nos parasitos da cepa Y a formação de aglomerados (“clusters”) de partículas de FC na membrana flagelar, que emerge o flagelo da bolsa flagelar (**Fig. 7A**). Ao microscópio de varredura, observamos que as formas tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener apresentam vesículas aderidas à sua superfície, nas regiões anterior e posterior do parasito, bem como no flagelo e na região da bolsa flagelar por onde o flagelo emerge (**Fig. 7B, E**).

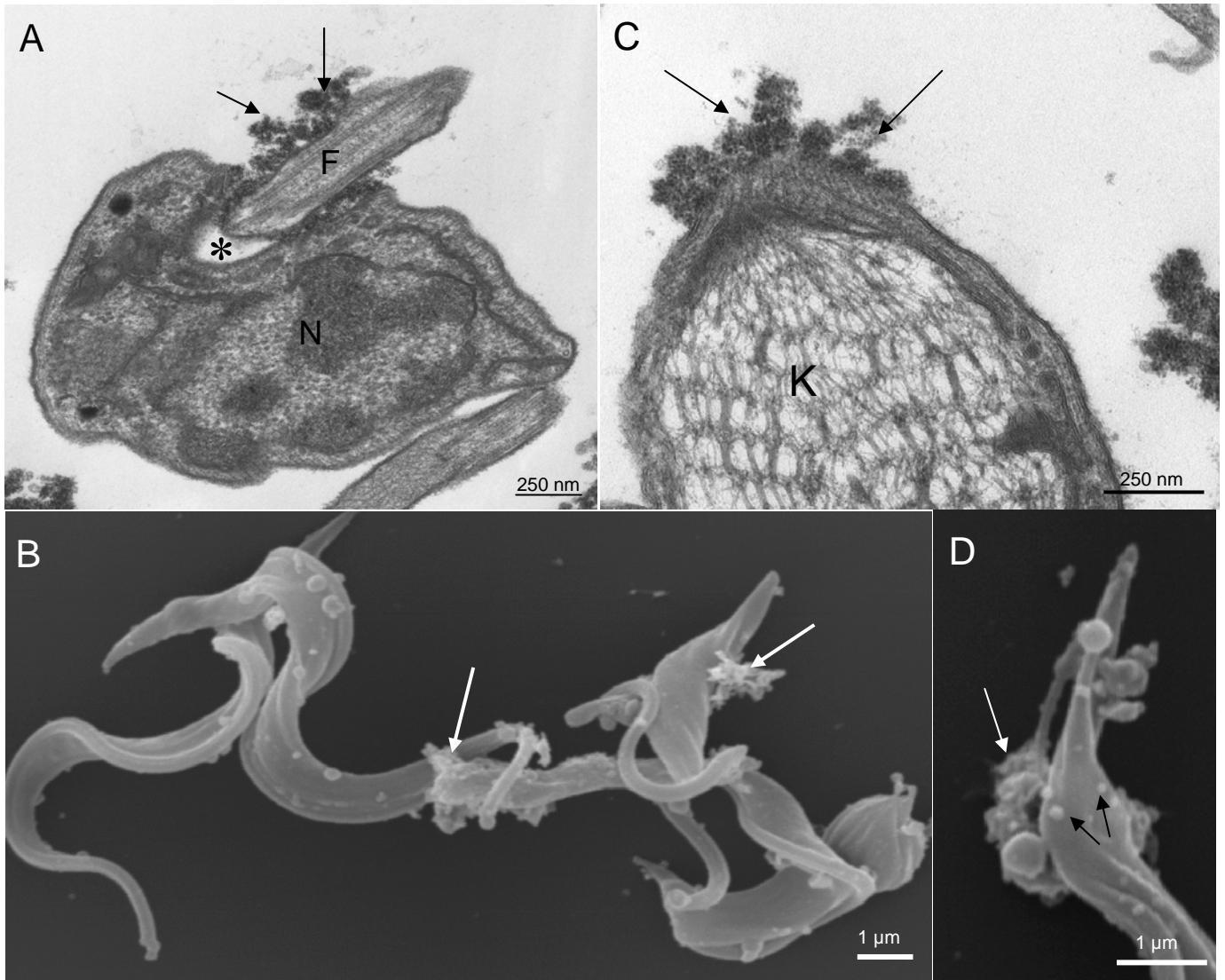
A incubação dos tripomastigotas vivos da cepa Y a 4°C por 30 minutos, na presença de FC, provocou um rearranjo dessas partículas, uma vez que agregados de FC maiores do que aqueles detectados os parasitos pré-fixados, foram observados sobre o flagelo e na região da entrada da bolsa flagelar (**Fig. 8A**). A análise no MEV mostrou vesículas de tamanhos variáveis e os grumos de partículas liberadas pelo parasito (**Fig. 8B**). Nessa temperatura, observamos por MET, que os tripomastigotas do clone CL-Brener mantiveram a distribuição uniforme de partículas de FC por toda a célula e membrana flagelar, conforme observado nas células pré-fixadas (**Fig. 9B**). Diferentemente da cepa Y, os parasitos do clone CL-Brener praticamente não apresentaram grumos de partículas sendo liberados do flagelo ou na região da saída da bolsa flagelar. Algumas vesículas, desprovidas de FC e maiores do que aquelas observadas na cepa Y, se projetam da membrana do corpo na saída da bolsa flagelar (**Fig. 9B**). Imagens, obtidas por MEV, mostraram que as células apresentaram poucas vesículas em relação ao que foi observado nas células pré-fixadas, confirmando as análises feitas por MET, nas quais as células apresentaram uma marcação de FC mais homogênea, com poucos perfis de “shedding” (**Fig. 9A**).

Uma incubação adicional dos parasitos vivos por mais 30 minutos a 37°C mostrou ainda mais diferenças entre o comportamento das duas amostras. Observamos que os tripomastigotas da cepa Y incubados por 30 minutos a 4°C com FC e, a seguir, por mais 30 minutos a 37°C, mostraram um perfil de “shedding” bem mais intenso, quando comparado aos parasitos incubados a 4°C. A primeira constatação é de que a grande maioria da superfície celular dos tripomastigotas não apresentava partículas de FC e que grumos de partículas podem ser observados no espaço entre as células e na porção posterior do corpo do parasito (**Fig. 8C**). As imagens de microscopia de varredura confirmam as informações obtidas com a transmissão, mostrando também a presença de vesículas aderidas aos grumos liberados na porção posterior do corpo (**Fig. 8D**). Pequenas vesículas são observadas sobre o corpo do parasito (**Fig. 8D**).





**Figura 7 – Localização de FC em tripomastigotas pré-fixados.** Tripomastigotas da cepa Y (A-C) e do clone CL-Brener (D-F) foram fixados e posteriormente incubados na presença de  $10\mu\text{g}$  de FC. Imagens de MET (A,C,D,F) mostram que tripomastigotas da cepa Y apresentam uma camada densa mas com regiões não marcadas com essas partículas (cabeça de seta em A) e a formação de “clusters” de FC na membrana flagelar na região da bolsa flagelar que emerge o flagelo (seta em A) bem como a liberação de perfis de membrana intensamente marcados com FC (setas em C). Parasitos do clone CL-Brener apresentam uma camada homogênea marcada com partículas de FC (setas em D) e vesículas liberadas na região do flagelo marcadas com FC (asterisco em D) bem como perfis de membrana não marcados com (setas em F). Observamos por MEV que ambas as amostras do *T. cruzi*, apresentaram vesículas na região posterior e anterior do parasito bem como no flagelo e na saída da bolsa flagelar (B,E). Barras em B e E correspondem a  $1\mu\text{m}$ .



**Figura 8 – Localização de sítios de ligação a FC em formas tripomastigotas vivas pertencentes à cepa Y.** Tripomastigotas vivos da cepa Y foram incubados a 4 (A-B) e a 37°C (C-D) na presença de 10µg/mL de FC e observados por MET (A,C) e MEV (B, D). Observamos através do MET redução na marcação de FC na superfície do parasito após 30 min a 4°C (A) e um aumento de aglomerados de partículas no flagelo e na saída da bolsa flagelar (setas em A). Os parasitos que foram submetidos a uma incubação adicional a 37°C também apresentaram grumos na região posterior da célula (setas em C). Por MEV observamos vesículas distribuídas pela região anterior do corpo do parasito e os grumos de partículas na região de saída da bolsa flagelar e sobre o flagelo (setas brancas em B). Quando os parasitos são incubados a 37°C por mais 30 minutos, observamos um perfil de shedding bem mais intenso que a 4°C, sendo detectadas vesículas de shedding na região posterior do corpo além da presença de grumos (seta branca em D) e de pequenas vesículas sobre o corpo (setas pretas em D). F = flagelo; N = núcleo, K = cinetoplasto

No caso dos tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener observamos, através do MET, que a marcação de superfície ainda se mantém e que vesículas maiores do que as encontradas nas células pré-fixadas ou incubadas a 4°C são observadas brotando da membrana do corpo, na saída da bolsa flagelar (**Fig. 9C**). Projeções de membrana recobertas por FC puderam ser observadas em secções ultra-finas ao MET (**Fig. 9D**).

Os dados mostram um comportamento diferente em relação à dinâmica de sítios aniônicos da superfície das duas amostras analisadas.

#### 4.1.2. Comportamento dos sítios ligantes de Con A

Tripomastigotas da cepa Y (**Fig. 10A**) e do clone CL-Brener (**Fig. 10B**) pré fixados e incubados na presença do complexo ConA-ouro coloidal apresentam uma camada contínua de partículas de ouro sobre as membranas do corpo celular e do flagelo. Partículas de ouro coloidal não foram observadas no interior da bolsa flagelar dos parasitos pré-fixados, indicando que esses marcadores normalmente não têm acesso ao interior da estrutura, devido à forte adesão do flagelo à membrana do corpo celular. A análise por MEV dos parasitos do controle de ambas as amostras do *T. cruzi* apresentaram o mesmo aspecto descrito no controle dos experimentos de ferritina (**Figs 7B, 7E**). A análise por citometria de fluxo, entretanto, mostrou que a ligação de ConA-FITC sobre tripomastigotas pré-fixados da cepa Y é menos intensa do que sobre tripomastigotas do clone CL-Brener (**Fig. 11**).

Quando parasitos vivos são incubados a 4°C por 30 minutos na presença de ConA-FITC, posteriormente fixados e analisados por citometria de fluxo observamos uma queda acentuada na intensidade de marcação que foi de 53 e 80 % para tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener, respectivamente (**Fig. 11**). Por MET, observamos que os tripomastigotas da cepa Y apresentam uma menor quantidade de partículas de ouro sobre sua superfície, mas, que as mesmas encontram-se distribuídas homoganeamente por todo o corpo celular (**Fig. 12A**). Por microscopia de varredura (**Fig. 12B**) observamos a presença de vesículas de até 1 µm aderidas sobre o corpo do parasito. Os tripomastigotas do clone CL-Brener, no entanto, apresentaram um comportamento bastante diferente do descrito para a cepa Y. Observamos uma intensa redistribuição dos sítios de ligação com a ConA a 4°C (**Fig 13A**), no qual as partículas de ouro foram localizadas na região de adesão entre o flagelo e o corpo celular e no interior da bolsa flagelar (**Fig. 13A**), indicando que mesmo a 4°C sítios de ligação de ConA podem se mover no plano da membrana. Quando analisadas ao MEV, parasitos do clone CL-Brener apresentaram comportamento semelhante à cepa Y.

Com a incubação adicional a 37°C, verificamos por citometria de fluxo que os parasitos da cepa Y apresentaram uma redução de 13% na intensidade de fluorescência, indicando que esses parasitos eliminaram sítios de ligação durante este período (**Fig. 11**). Quando analisados ao MEV, alguns parasitos da cepa Y apresentaram um aumento de perfis de “shedding” em relação às células incubadas a 4°C e a presença de pequenas vesículas ligadas à superfície, semelhante ao que foi verificado com a incubação na presença de FC (**Fig. 12D**). A análise por MET mostrou uma grande quantidade de vesículas contendo partículas de ouro coloidal na proximidade dos parasitos (**Fig. 12C**). Parasitos do clone CL-Brener não apresentaram mudança significativa na intensidade de marcação, quando analisados por citometria de fluxo (**Fig. 11**), indicando que estes parasitos não perderam sítios de ligação com a ConA durante a incubação a 37°C (**Fig. 11**). Da mesma maneira, a análise ao MET mostrou que a distribuição das partículas de ouro (**Fig. 13C**) era a mesma observada a 4°C. Quando analisadas ao MEV, parasitos do clone CL-Brener apresentaram comportamento semelhante à cepa Y (**Fig. 13B-D**).

#### 4.1.3. Efeito da incubação com FC e ConA na lise de tripomastigotas por anticorpos

Estudos prévios demonstraram que a presença de ácido siálico previne a lise das formas tripomastigotas pelo sistema complemento e por anticorpos Ch anti- $\alpha$ -gal (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000). Como durante a incubação com a FC, que se liga a cargas negativas, e a ConA observamos alterações significativas na superfície das tripomastigotas das duas amostras, decidimos, então, analisar se essas alterações levariam a alguma modificação na sobrevivência dos parasitos, que foi medida pela contagem de tripomastigotas móveis e não aglutinados após a incubação com os diferentes protocolos do experimento.

Tripomastigotas das duas amostras de *T. cruzi*, incubados na presença de Ch anti- $\alpha$ -gal (20 $\mu$ g/ml) em meio RPMI sem SFB, apresentaram comportamentos distintos. Tripomastigotas da cepa Y apresentaram uma redução de 33% de parasitos móveis e livres, diferentemente ao observado nos tripomastigotas pertencentes ao clone CL-Brener que tiveram uma redução de apenas 2% (**Fig. 14A**). Esses dados demonstram que parasitos da cepa Y são mais susceptíveis ao Ch anti- $\alpha$ -gal, quando comparados ao clone CL-Brener. A diferença entre as amostras incubadas na presença do anticorpo é estatisticamente significativa com  $P < 0,001$  (**Fig. 14A**).

A incubação de tripomastigotas somente com 10  $\mu$ g/ml de FC e Con A promoveu uma pequena redução no número de parasitos móveis, em ambas as amostras do *T. cruzi* (**Fig. 14A**), que não são estatisticamente relevantes.

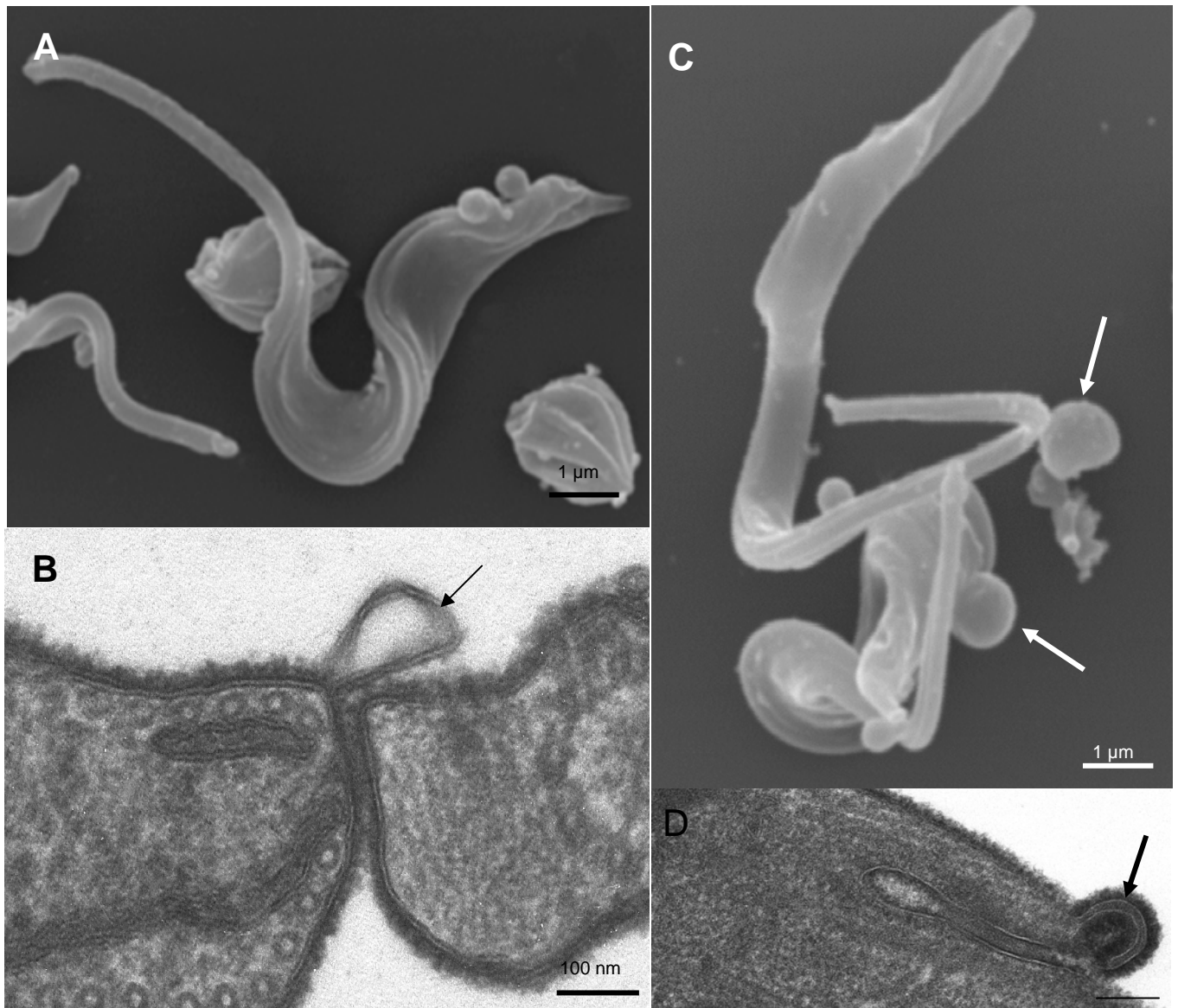
A seguir, avaliamos o efeito de uma incubação prévia dos parasitos com FC e ConA, seguida da incubação por 30 minutos a 37°C com o anticorpo anti- $\alpha$ -gal (Figs 14A-C). Observamos que tripomastigotas da cepa Y apresentaram uma menor porcentagem de parasitos imóveis na presença do Ch anti- $\alpha$ -gal, quando comparados aos parasitos incubados somente na presença do anticorpo, mostrando que, de certa forma, a ligação da FC e da ConA protege esses parasitos da lise pelo anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal (**Fig. 14A**). As diferenças na porcentagem de parasitos móveis entre aqueles incubados somente na presença do anticorpo com os que foram incubadas com FC e ConA e posteriormente com o anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal são estatisticamente significativas com  $P < 0,001$ . Os mesmos tratamentos não produziram diferenças significativas na porcentagem de motilidade e tripomastigotas móveis no clone CL-Brener (**Fig. 14A**).

Como obtivemos uma diferença significativa na motilidade dos tripomastigotas, principalmente na cepa Y, após a incubação com a FC e a ConA, decidimos avaliar, por citometria de fluxo, o grau de ligação do anticorpo anti- $\alpha$ -gal nos parasitos controle e previamente tratados com essas duas substâncias. A análise da ligação do anticorpo nas populações controle mostrou duas características importantes (**Figs 14B-C**): a) que as duas populações de tripomastigotas possuem diferenças no padrão de marcação. Os tripomastigotas da cepa Y apresentam duas populações distintas enquanto os parasitos do clone CL-Brener apresentam uma população única (**Figs 14B<sub>1</sub>, B<sub>4</sub>**); b) que a mediana do valor de fluorescência é maior nos tripomastigotas da cepa Y do que nos do clone CL-Brener (**Fig. 14C**). A ligação de FC em tripomastigotas da cepa Y modificou significativamente o padrão de marcação da população. A população mais marcada, pico menor à direita do gráfico (**Fig 14B<sub>2</sub>**), não é mais observada e os parasitos marcados se concentram em uma população única, embora com características heterogêneas (distribuição alargada). A medida da mediana de fluorescência dos parasitos incubados com FC é bem inferior a dos parasitos incubados somente na presença do anticorpo (**Fig. 14C**). Modificações importantes no padrão de marcação da população foram também observadas, após a incubação com a ConA. Embora a mediana do valor de fluorescência não apresente uma redução tão acentuada, como ocorreu com a incubação com a FC (**Fig.14C**), a distribuição dos parasitos na população gerou novamente duas populações, com uma grande quantidade de parasitos concentrados no lado esquerdo do gráfico (**Fig. 14B<sub>3</sub>**).

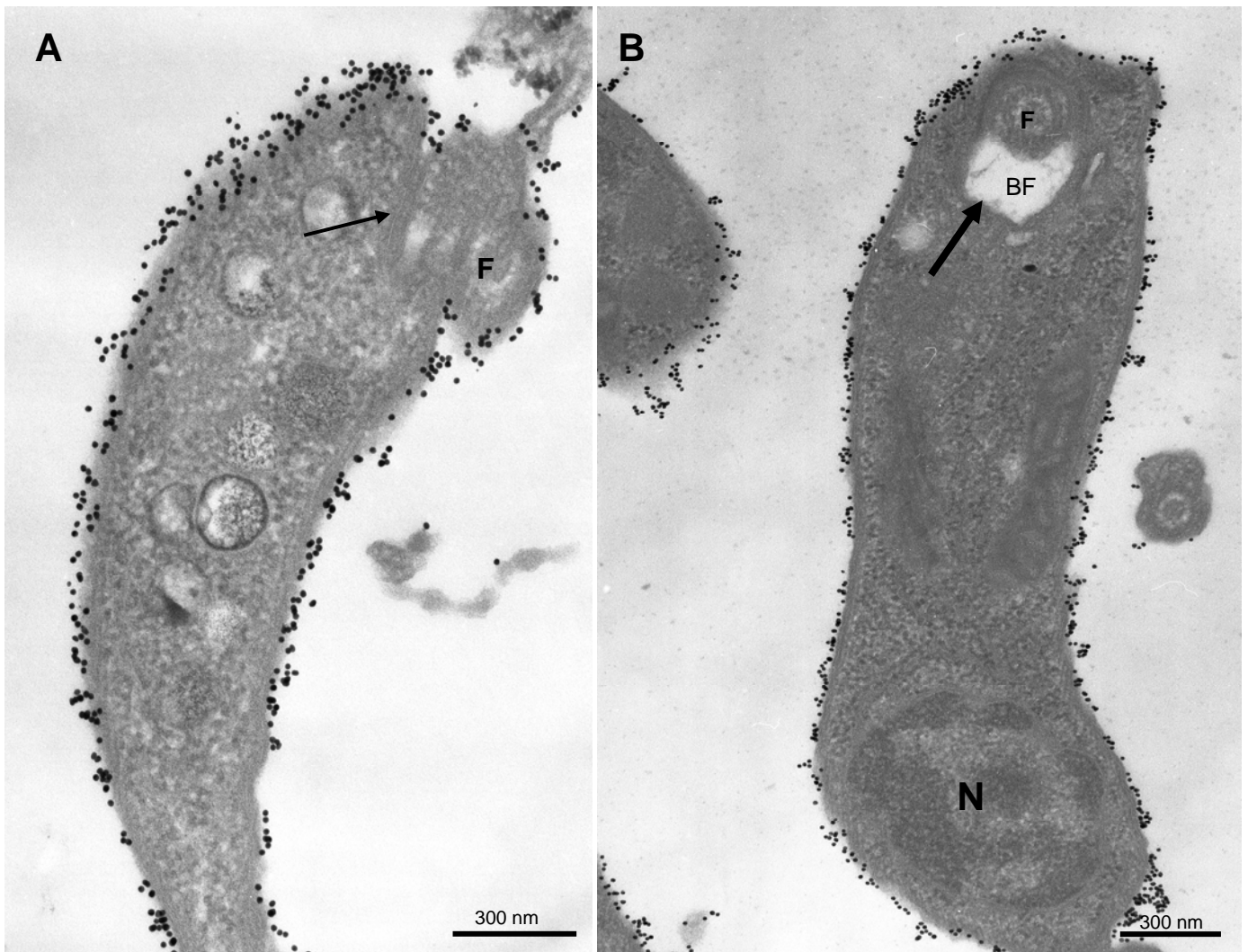
A pré-incubação com a FC e a Con A também modificou o padrão de fluorescência dos tripomastigotas do clone CL-Brener. Embora a população se distribua em um único pico de marcação, observamos modificação na distribuição dos parasitos marcados (**Figs 14B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>**). Essa diferença pode ser observada na figura 14C, onde verificamos que a mediana da

fluorescência dos tripomastigotas pré-incubados com FC sofre uma redução, enquanto que a incubação com a ConA aumenta a ligação com o anticorpo anti- $\alpha$ -gal.

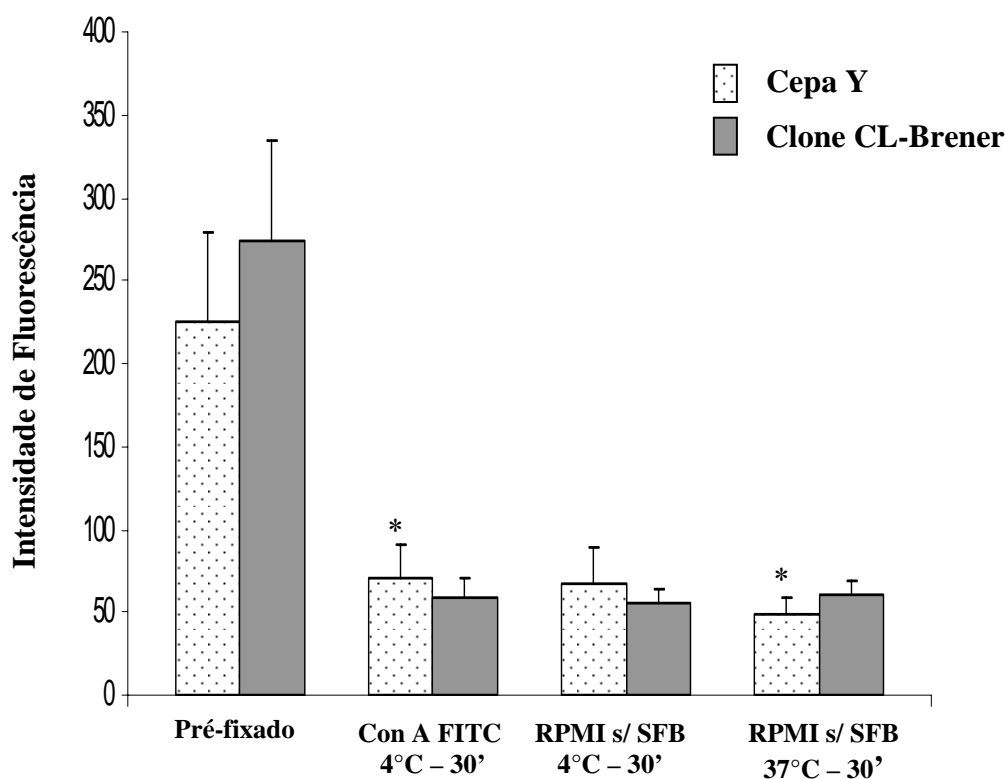
A análise de tripomastigotas da cepa Y, por imunofluorescência, mostrou uma marcação uniforme dos sítios reconhecidos pelo anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal por todo o corpo celular do parasito, tanto naqueles que foram apenas incubados com esse anticorpo, quanto os que foram previamente incubados com FC e ConA (**Fig. 14D**).



**Figura 9 – Localização de sítios de ligação a FC em formas tripomastigotas vivas pertencentes ao clone CL-Brener.** Tripomastigotas vivos do clone CL-Brener foram incubados a 4 (A-B) e a 37°C (C-D) na presença de 10 $\mu$ g/mL de FC e observados por MET (A,C) e MEV (B, D). Observamos na incubação a 4°C por MET, uma camada homogênea de partículas de FC no corpo celular do parasito (B) com vesículas brotando, aparentemente, desprovidas de partículas de FC (seta). Imagem de MEV (A), mostra que as células apresentam poucas vesículas na região da saída da bolsa flagelar localizadas na mesma região mostrada em B. Após a incubação adicional a 37°C a marcação é ainda intensa (D) e grandes projeções de membrana contendo FC se projetam da membrana do corpo na saída da bolsa (seta em D) dando origem à imagem de grandes vesículas, de até 1  $\mu$ m de diâmetro (seta branca em C) na mesma região apontada em D. Barra em D = 100 nm.

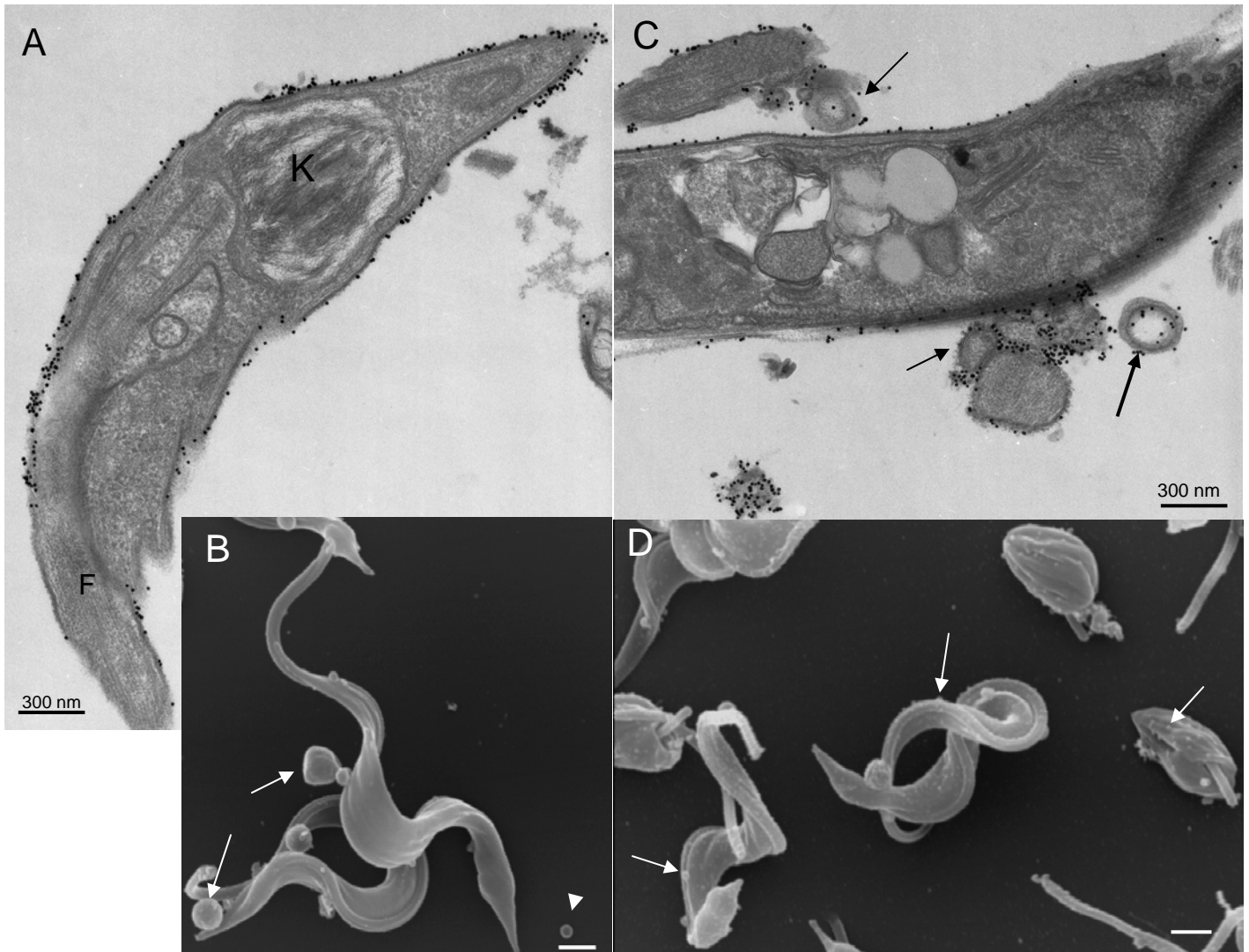


**Figura 10 – Localização de sítios de ligação de ConA em parasitos pré fixados.** Tripomastigotas da cepa Y (A) e do clone CL-Brener (B) foram fixados e incubados na presença do complexo ConA-ouro coloidal (8-10 nm). (A) A análise por microscopia de transmissão mostra que as formas tripomastigotas da cepa Y uma densa de partículas de ouro sobre a membrana do corpo celular e do flagelo célula. Não são observadas partículas na região de adesão entre o flagelo e o corpo celular (seta em A). (B) A distribuição dos sítios de ligação com o complexo ConA-ouro coloidal nos tripomastigotas do clone CL-Brener é semelhante a observada na cepa Y. Não foram observadas partículas de ouro no interior da bolsa flagelar (seta) . BF = bolsa flagelar; F = flagelo; N = núcleo.

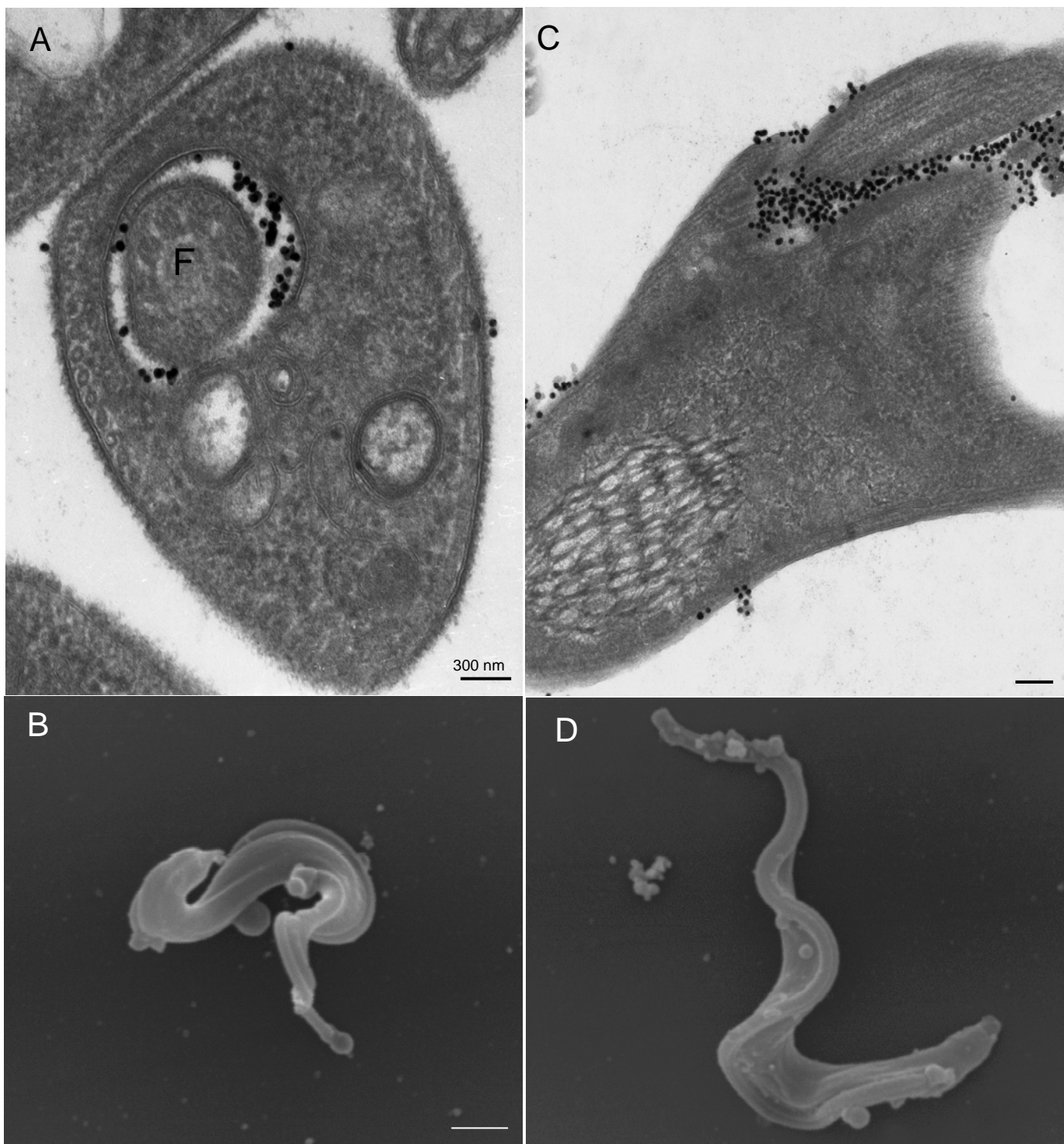


**Figura 11 – Análise quantitativa do “shedding” de sítios de ligação de Con A da superfície dos tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener.** Parasitos incubados na presença de 10g/mL de ConA-FITC de acordo com os seguintes procedimentos: **a)** parasitos pré-fixados; **b)** parasitos vivos incubados por 30 min a 4°C; **c)** parasitos vivos incubados como descrito em **c** foram lavados a 4°C em meio RPMI sem soro e incubados por um período adicional de 30 min a 4°C em RPMI sem soro; **d)** parasitos vivos incubados como descrito em **b**, lavados a 4°C em meio RPMI sem soro e incubados por mais 30 min a 37°C em RPMI. Parasitos pré-fixados (**a**) apresentam uma marcação nos tripomastigotas do clone CL-Brener 40% mais intensa do que nos parasitos da cepa Y. A 4°C por 30 minutos (**b**), observamos uma queda acentuada na intensidade de marcação que foi de 53 e 80% para tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener, respectivamente. Após a incubação como descrito em (**c**), verificamos que ambas as amostras permanecem com a mesma marcação que em **b**. A 37°C (**d**), os parasitos da cepa Y apresentam uma redução de 13% na intensidade de fluorescência indicando que esses parasitos eliminaram sítios de ligação durante este período, diferentemente ao observado nos parasitos do clone CL-Brener a 37°C. Dados descritos com média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Diferenças entre os grupos não são estatisticamente significantes ( $p > 0.01$ ). Os asterísticos indicam os tratamentos que são estatisticamente significantes em parasitos da cepa Y.

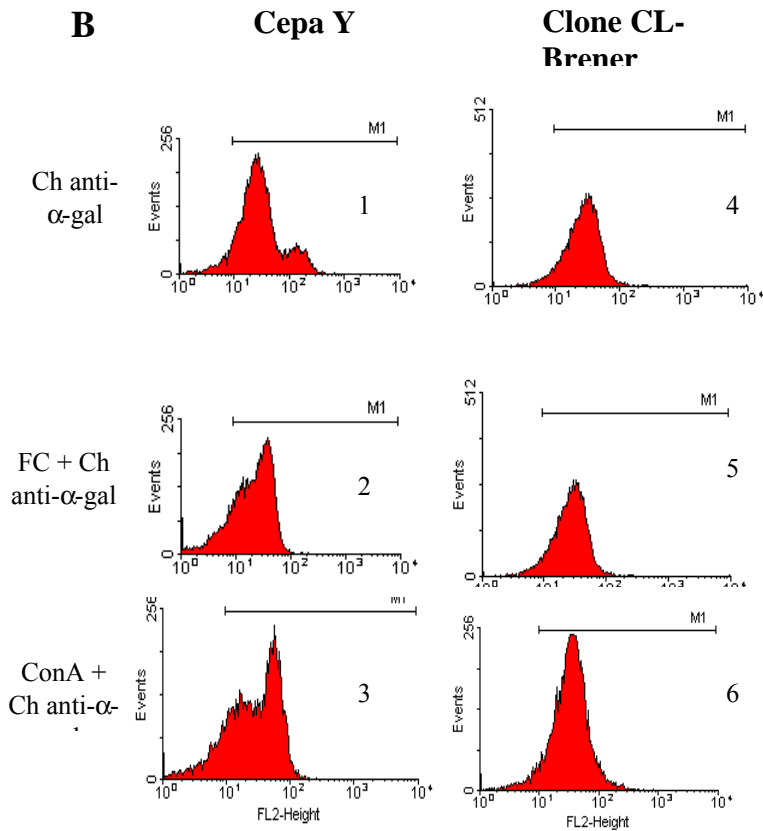
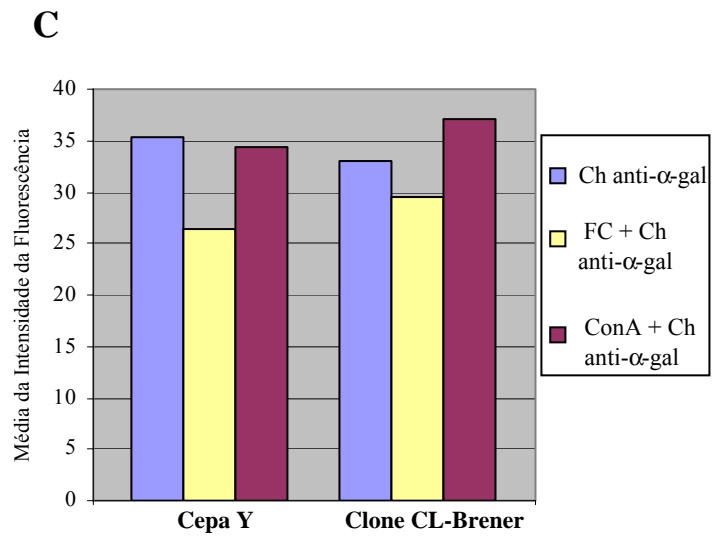
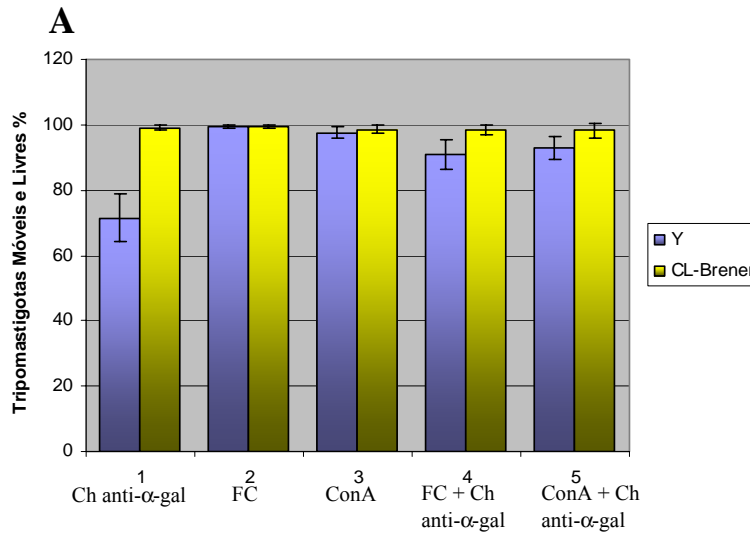




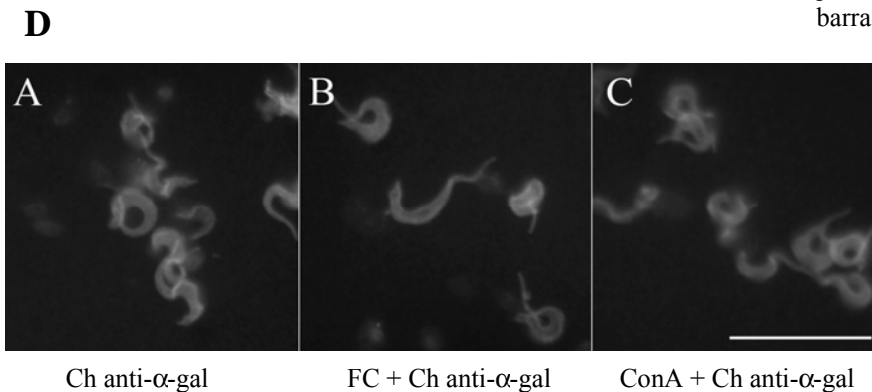
**Figura 12 – Localização de sítios de ligação de ConA em tripomastigotas vivos pertencentes a cepa Y.** Tripomastigotas vivos da cepa Y foram incubados a 4 (A-B) e a 37°C (C-D) na presença de 10µg/mL de FC e observados por MET (A,C) e MEV (B, D). Quando os tripomastigotas são incubados a 4°C por 30 minutos, observa-se uma menor quantidade de partículas de ouro sobre as membranas do corpo e do flagelo (A). A análise por MEV mostra vesículas (setas brancas) aderidas aos parasitos ou aderidas sobre a laminula (cabeça de seta branca). Algumas vesículas apresentam aproximadamente 1 µm (seta branca). Após a incubação adicional a 37°C, os parasitos continuam a apresentar marcação por todo o corpo celular porém é reduzida significativamente em relação ao verificado a 4°C (C). São observadas árias vesículas e perfis de membrana marcados com partículas de ouro coloidal (setas). Quando esta amostra é observada ao MEV (D) observamos a presença de vesículas grandes e de pequenas vesículas que variam 200nm a 1µm (seta branca) sobre a membrana das formas tripomastigotas e amastigotas. As barras nas figuras de MEV correspondem a 1 µm.



**Figura 13 – Localização de sítios de ligação de ConA em tripomastigotas vivos pertencentes ao clone CL-Brener.** Na incubação a 4°C observa-se uma diminuição de marcação com ConA na superfície do corpo celular do parasito havendo a redistribuição dessas partículas de ouro, concentrando-se na zona de adesão do flagelo (A). Quando analisados ao MEV, os parasitos apresentaram poucas vesículas (B). A 37°C (C-D) observamos por MET e o mesmo perfil de distribuição da ConA observado a 4°C (C). Os parasitos observados por MEV (D) apresentam diferentes tamanhos de veículas aderidas ao corpo celular e flagelo. Barras = 300 nm (A, B); 1μm (C,D)



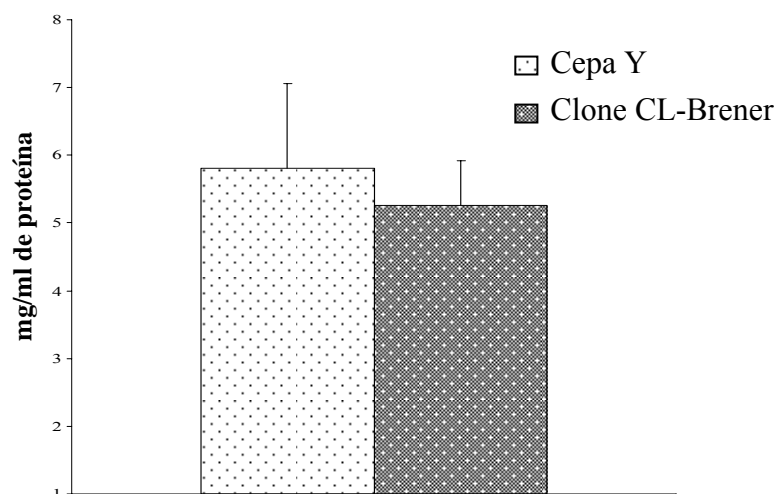
**Figura 14** – Reconhecimento dos parasitos pelo anticorpo anti- $\alpha$ -gal é modificado após ligação de FC e ConA. **(A)** Efeito de anti- $\alpha$ -gal na sobrevivência foi medida pela quantificação de parasitos móveis. 1-parasitos controle incubados na presença do anticorpo; 2-parasitos incubados na presença de 10 $\mu$ g/mL FC; 3-parasitos incubados na presença de 10 $\mu$ g/mL ConA; 4-parasitos foram incubados por 10 min na presença de 10 $\mu$ g/mL FC e então na presença de 20 $\mu$ g/mL de Ch anti- $\alpha$ -gal durante 30 min a 37°C; 5- parasitos foram incubados por 10 min na presença de 10 $\mu$ g/mL ConA e então na presença de 20 $\mu$ g/mL de Ch anti- $\alpha$ -gal durante 30 min a 37°C. Todos os resultados obtidos com a cepa Y apresentam diferenças estatisticamente significativas com valores de  $P < 0,05$  e  $0,001$ . A diferença entre o efeito de anti- $\alpha$ -gal sobre a população controle de Y e CL-Brener é estatisticamente diferente com  $P < 0,001$ . Os valores obtidos com o clone CL-Brener não são significativamente diferentes entre si.; **(B-C)** Análise por citometria de fluxo da ligação de anti- $\alpha$ -gal em parasitos controle (1 e 4) e incubados previamente com FC (2 e 5) e com ConA (3 e 6). Em B observa-se a distribuição da marcação na população dos parasitos e em C a mediana do valor de fluorescência. ; **(D)** análise por imunofluorescência de tripomastigotas da cepa Y mostra que o tratamento com FC e ConA não provoca a formação de domínios na membrana do parasito com diferentes intensidades de marcação. A barra representa 20  $\mu$ m.



#### 4.2. Avaliação das proteínas totais liberadas no meio pelo parasito na ausência de soro fetal bovino

Trabalhos anteriores, que avaliaram a liberação de moléculas de *T. cruzi* no meio de cultura, utilizaram meios de incubação com porcentagens variadas de soro fetal bovino (GONÇALVES *et al.*, 1991; TORRECILHAS *et al.*, 2009). O soro possui uma grande quantidade de exossomos, que são vesículas de 30-100 nm de diâmetro (revisado em OLVER *et al.*, 2007; OCHIENG *et al.*, 2009). Como uma das finalidades do nosso estudo era de analisar vesículas liberadas pelo parasito, cujas dimensões são muito semelhantes à dos exossomos, resolvemos então abolir a presença de soro nos meios de incubação (revisado em OLVER *et al.*, 2007; OCHIENG *et al.*, 2009).

Avaliamos tanto a quantidade total, quanto o tipo de proteínas liberadas no meio de incubação. Tripomastigotas ( $2 \times 10^7$  parasitos/ml) pertencentes às duas amostras foram incubados por 3 horas a 37°C, e a quantidade total de proteínas no sobrenadante foi dosada pelo método de Bradford. Esta análise não mostrou diferenças significativas na quantidade de proteínas totais liberadas para o meio extracelular pelos tripomastigotas das duas amostras, embora, em todos os experimentos, a quantidade liberada pela cepa Y tenha sido maior do que aquela encontrada nas análises do clone CL-Brener (Fig. 15).



**Figura 15 – Análise quantitativa das proteínas liberadas pelas formas tripomastigotas do *T. cruzi*.** Dosagem de proteínas liberadas pelas formas tripomastigotas em meio de cultura sem soro durante 3 horas pelo método de Bradford. A análise estatística mostrou que a quantidade liberada pelos parasitos da cepa Y e do clone CL-Brener não é significativamente distinta. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ), sendo  $p>0,01$ .

Com o objetivo de identificar as proteínas liberadas no meio de incubação, analisamos o extrato total dos parasitos e o sobrenadante do meio de cultura após o ensaio de “shedding”

por SDS-PAGE (12%). Como controle para o nosso experimento, utilizamos parasitos recém retirados da cultura e que não foram submetidos à incubação em meio sem soro (**Fig. 15**). O perfil protéico dos tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener mostrou que tanto os parasitos controle quanto aqueles que foram incubados em meio HBSS expressam proteínas cujas massas moleculares variam de 25 a 110 kDa. Em ambas as amostras controle observamos a presença de uma proteína majoritária, com massa molecular aparente de 70 kDa. Os parasitos, submetidos à incubação por 3 h em meio sem soro, apresentaram uma redução de aproximadamente 60% na expressão da proteína de 70 kDa, confirmada através da análise densitométrica das bandas do gel (**Fig. 16**). Quando analisamos o sobrenadante, observamos que a proteína de 70 kDa, que teve sua expressão diminuída nos parasitos submetidos ao ensaio de “shedding”, é igualmente expressa no sobrenadante de ambas as formas tripomastigotas (**Fig. 16**). Além dessa proteína, observamos no sobrenadante obtido da incubação dos tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener, a expressão de diversas proteínas, que também são observadas no extrato total dos parasitos, como por exemplo, as proteínas com massas moleculares de 21 kDa, 50 kDa, 61 kDa, 80 kDa, 85 kDa, 89 kDa, dentre outras.

A análise do meio de incubação das formas tripomastigotas, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, mostrou a presença de vesículas de tamanhos variáveis (40-250 nm) (**Fig. 17**).

#### **4.3. Detecção das atividades proteolíticas totais obtidas durante ensaios de “shedding”**

A liberação de proteínas solúveis (“shedding” de ectodomínios) necessita da clivagem proteolítica de domínios extracelulares das proteínas transmembrana, através da ação de metaloproteases. Além disso, sabe-se que a liberação de vesículas contendo metaloproteases da matriz extracelular possibilita o efeito invasivo de células cancerígenas e durante a angiogênese (TARABOLETTI *et al.*, 2002) e a disseminação de células carcinogênicas de ovário (DOLO *et al.*, 1999). Devido à importância dessas proteases no processo de “shedding”, decidimos analisar o perfil proteolítico do sobrenadante obtido após o ensaio de “shedding”.

A análise do perfil proteolítico do extrato total dos parasitos e do sobrenadante total, em tampão fosfato pH 5.5, com 2 mM DTT (atividade para cisteíno proteinase) mostrou um comportamento distinto entre as amostras do *T. cruzi* analisadas nesse trabalho. O extrato total dos tripomastigotas da cepa Y apresentou duas bandas com massas moleculares correspondentes a 38 kDa e 44 kDa, enquanto que no clone CL-Brener é possível detectar, além dessas proteases, outras duas com massa molecular de 51 kDa e 57 kDa. A análise do

sobrenadante, obtido da incubação dos tripomastigotas da cepa Y, mostrou a expressão das proteases de 38 kDa e 44 kDa, enquanto que no clone CL-Brener observamos apenas a protease de 44 kDa (**Fig. 18A**).

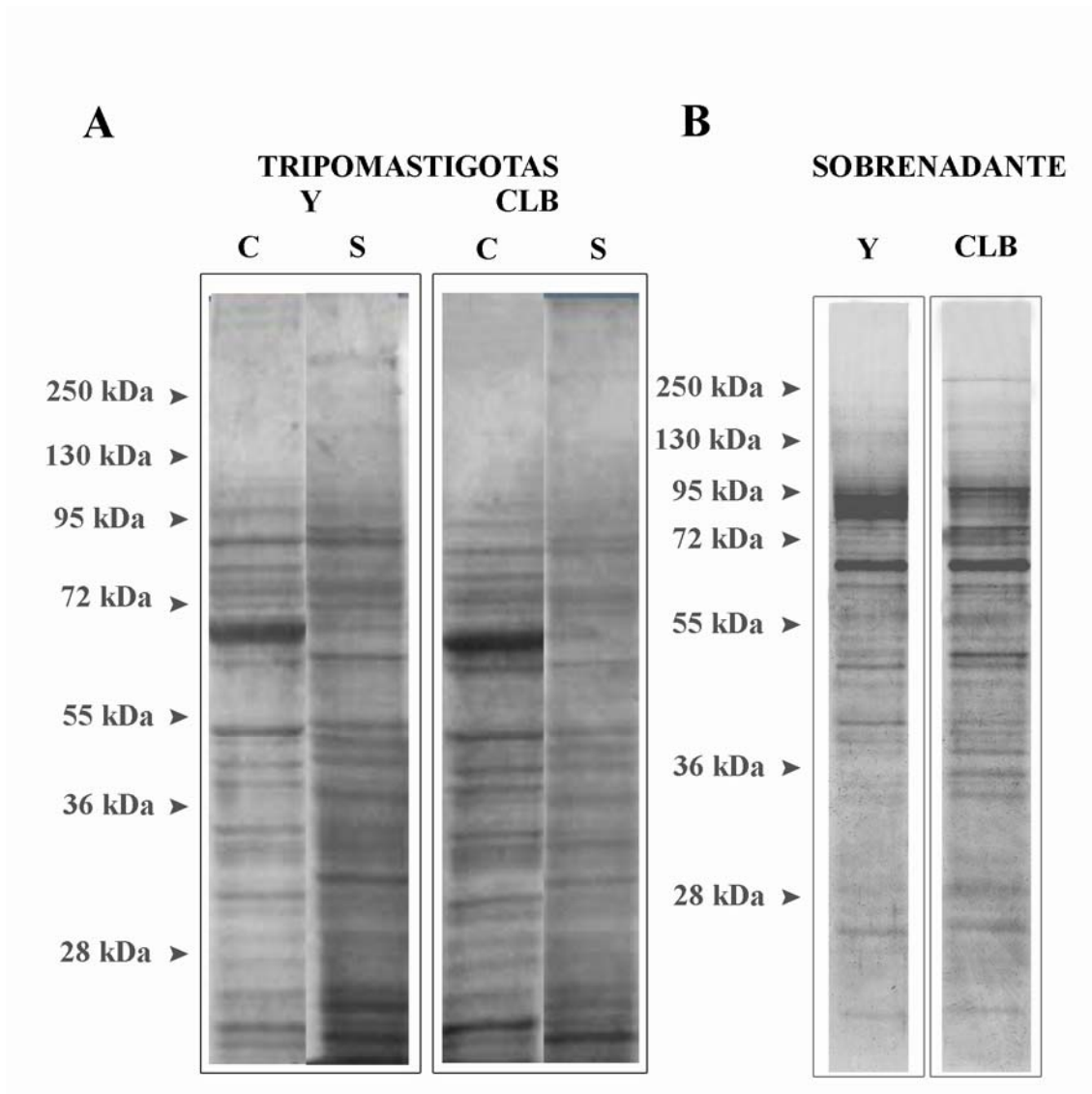
A incubação em tampão glicina pH 10 (atividade para metaloprotease) mostra, no extrato total das formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener, a presença de duas proteases, com massas moleculares equivalentes a 52 kDa e 78 kDa. No sobrenadante total de ambas as amostras observa-se a expressão da protease de 52 kDa. Entretanto, essa liberação para o meio extracelular ocorre mais intensamente nos parasitos da cepa Y. A análise densitométrica mostrou que a banda dos parasitos da cepa Y é 50% mais densa do que a observada para o clone CL-Brener (**Fig. 18B**).

#### **4.4. Influência do PMA no processo de “shedding”**

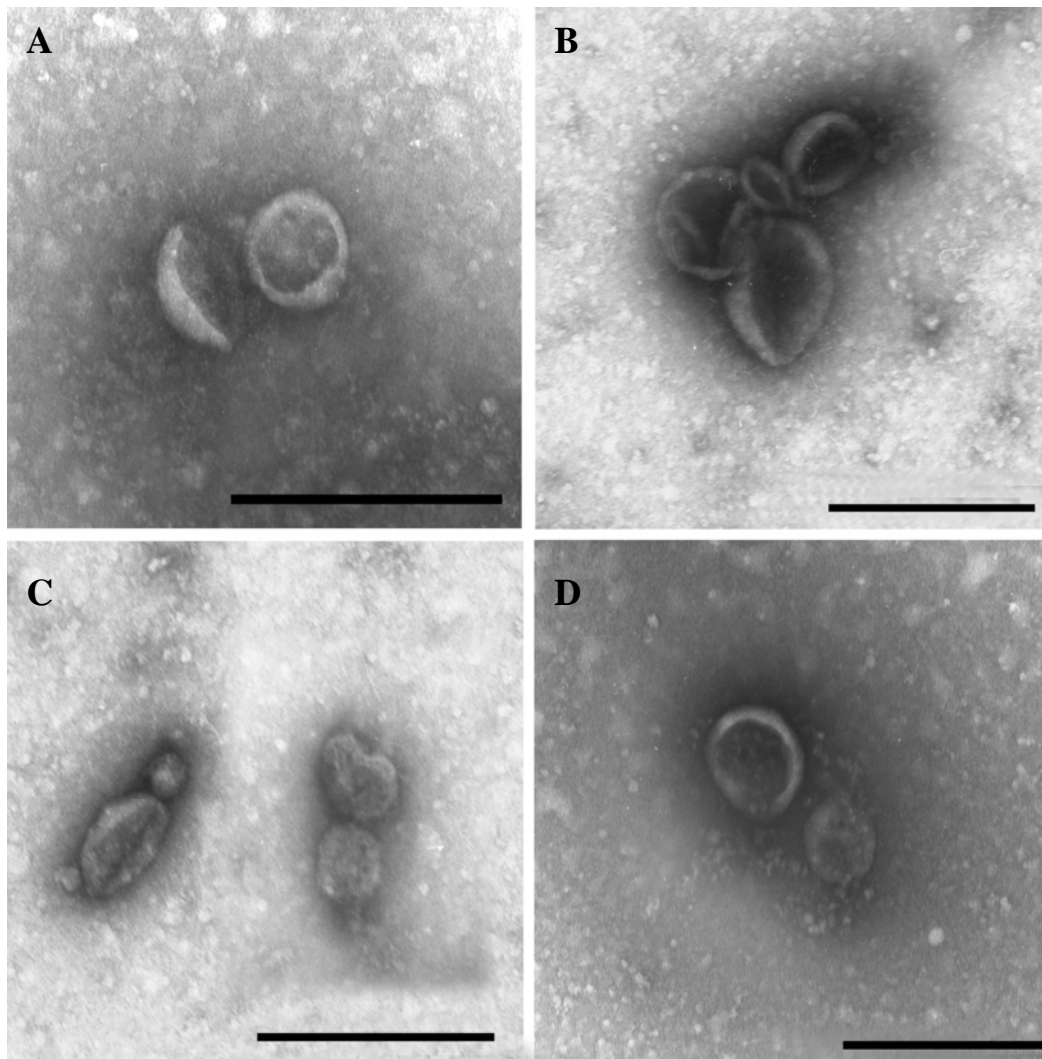
A ativação da proteína cinase C (PKC) foi o primeiro mecanismo intracelular reconhecido como um alvo comum para a sinalização que gera o “shedding” de ectodomínios em mamíferos (DELLO SBARBA & ROVIDA, 2002). Com intuito de elucidar se o mecanismo de “shedding” de ectodomínios é responsável pela dinâmica da superfície celular de *T. cruzi*, utilizamos como experimento piloto, o 13-acetato de forbol 12-miristato (PMA), que é um ativador inespecífico da proteína cinase C (PKC), através de experimentos realizados com formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y e do clone CL-Brener, através da análise quantitativa, qualitativa e ultraestrutural.

A análise quantitativa das proteínas liberadas no sobrenadante total mostrou que parasitos da cepa Y, tratados com PMA, liberam cerca de 13% a mais de proteínas, quando comparado com o controle (**Fig. 19**). Em contrapartida, não observamos influência significativa do PMA nos tripomastigotas do clone CL-Brener (**Fig. 19**).

Os perfis protéicos do extrato total das formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener, controle e tratado com PMA, apresentaram proteínas variando de 25 a 110 kDa, mantendo o mesmo padrão proteínas expressas, conforme descrito no item 4.2. (**Fig 20A**).

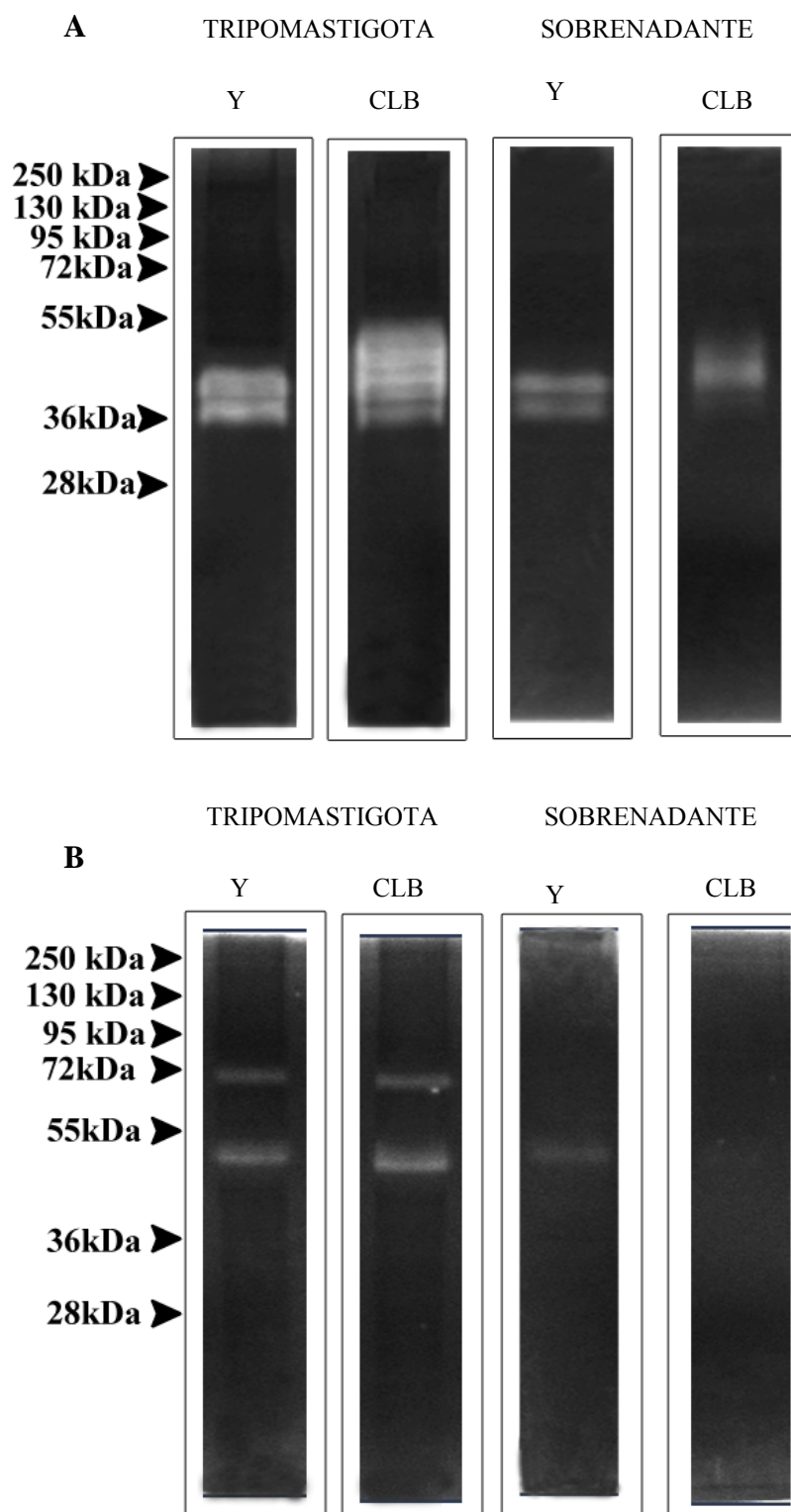


**Figura 16 – Detecção de proteínas do extrato e sobrenadante totais das formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener por SDS-PAGE (12%), coradas com Nitrato de Prata. Perfil protéico do extrato celular dos tripomastigotas controle (recém retirados da cultura) e daqueles submetido ao shedding (incubados a 37°C por 3 horas em meio HBSS sem adição de soro fetal bovino) pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener (A). Análise das proteínas expressas no sobrenadante obtido após o ensaio de “shedding” de ambas as amostras (B). C, controle; S, “shedding”.**



**Figura 17 – Detecção das vesículas de shedding no meio de incubação.** Vesículas liberadas por formas tripomastigotas durante os ensaios de shedding foram observadas em MET pela técnica de contração negativa. As vesículas apresentam entre 40 e 250nm. Barra = 300 nm.

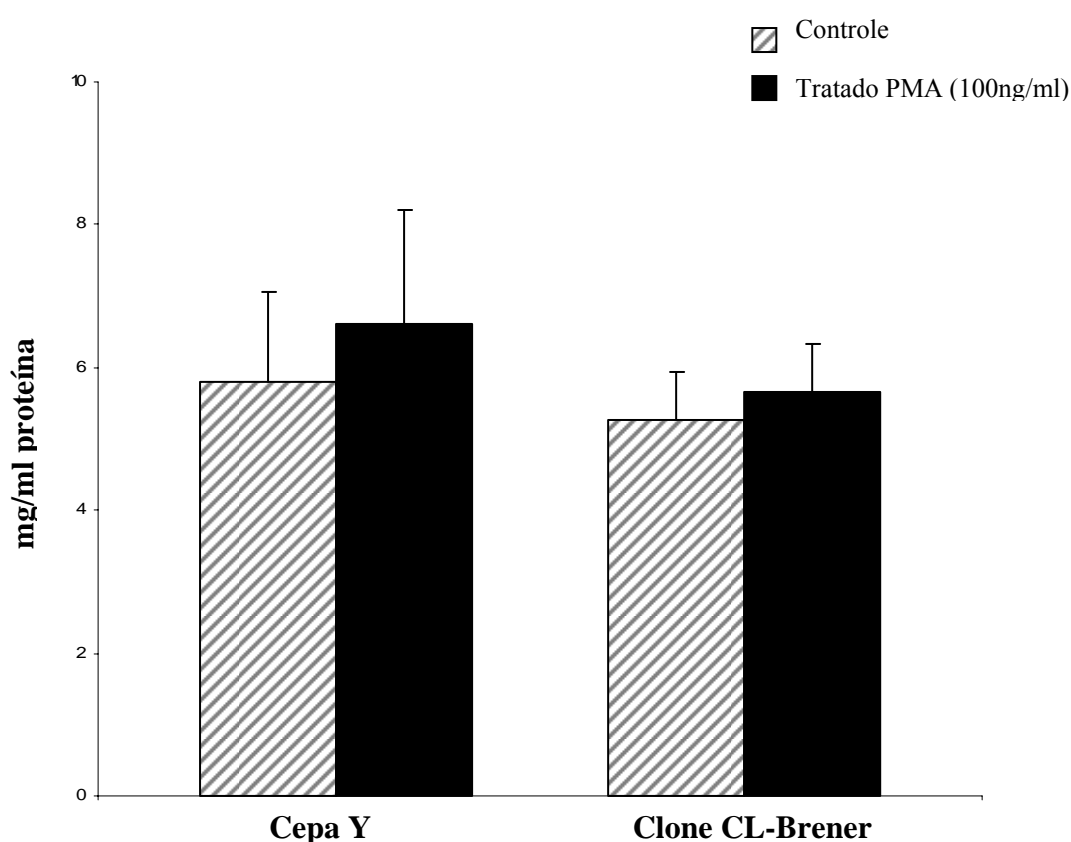




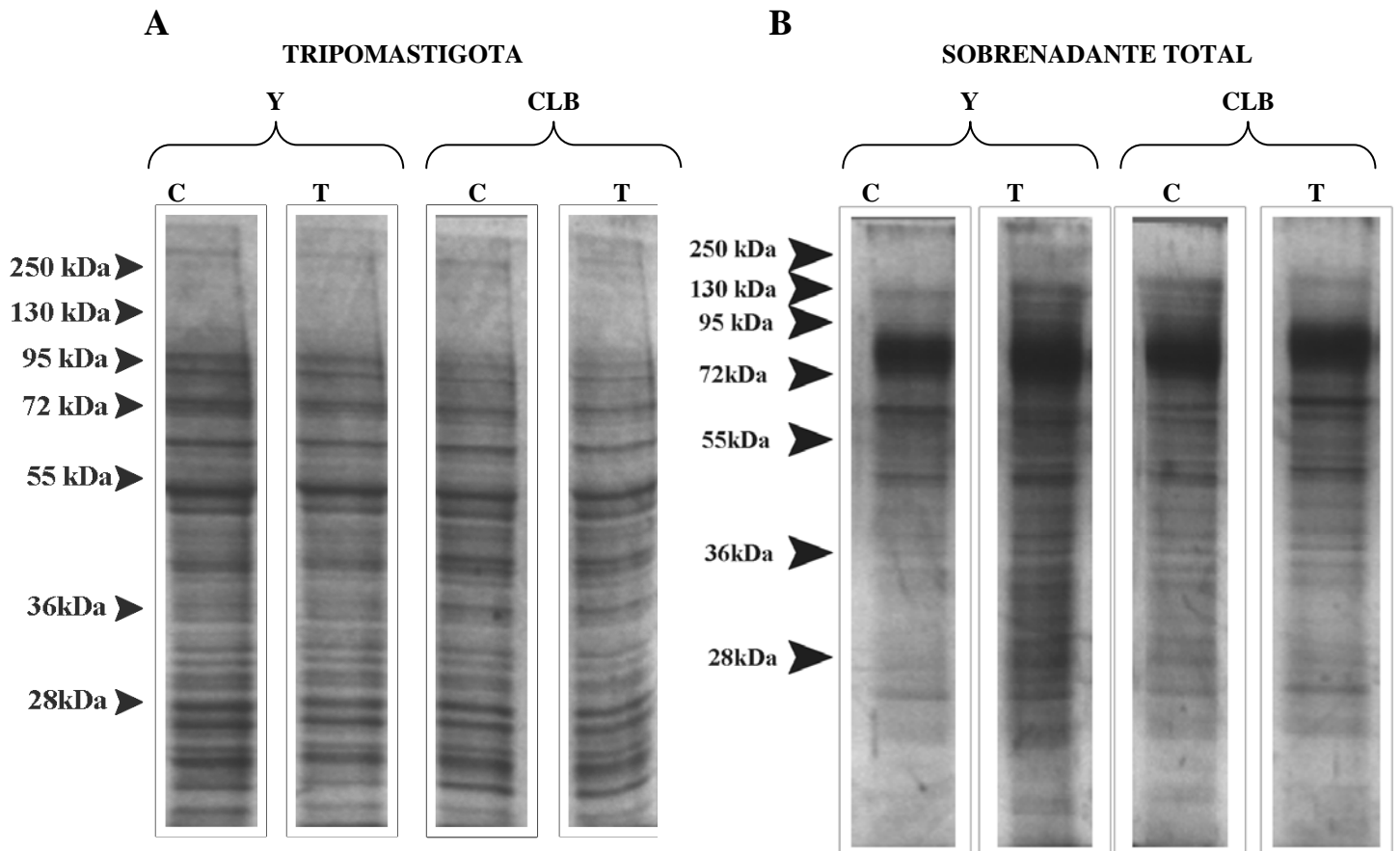
**Figura 18 – Análise em SDS-PAGE-gelatina das proteases presentes no extrato e sobrenadante totais das formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener em pH 5.5 suplementado com 2mM DTT(A) e em pH 10 (B).** Em pH 5,5 (A) detectamos no extrato total uma maior atividade proteolítica no clone CL-Brener. Observamos no sobrenadante total, proteases extracelulares em ambas as amostras, entretanto, uma maior liberação ocorre nos parasitos da cepa Y. Quando analisamos essas amostras em pH 10 (B), verificamos, tanto na cepa Y quanto no clone CL-Brener, a presença de duas proteases equivalentes a 52 kDa e 78 kDa. Entretanto, detectamos apenas no sobrenadante total, obtidos das duas amostras, a protease de 52 kDa sendo a liberação 50% maior na cepa Y.

A detecção por SDS-PAGE das proteínas liberadas no sobrenadante total de tripomastigotas da cepa Y, após tratamento com PMA, mostrou que a grande maioria das bandas observadas teve sua expressão aumentada, em relação ao controle, o que foi confirmado pela análise densitométrica (Fig. 20B). Os parasitos do clone CL-Brener mantiveram a mesma expressão de proteínas após o tratamento com PMA, sugerindo, assim que o processo de “shedding” nas formas tripomastigotas do clone CL-Brener, aparentemente, não é influenciado pelo PMA (Fig. 20B).

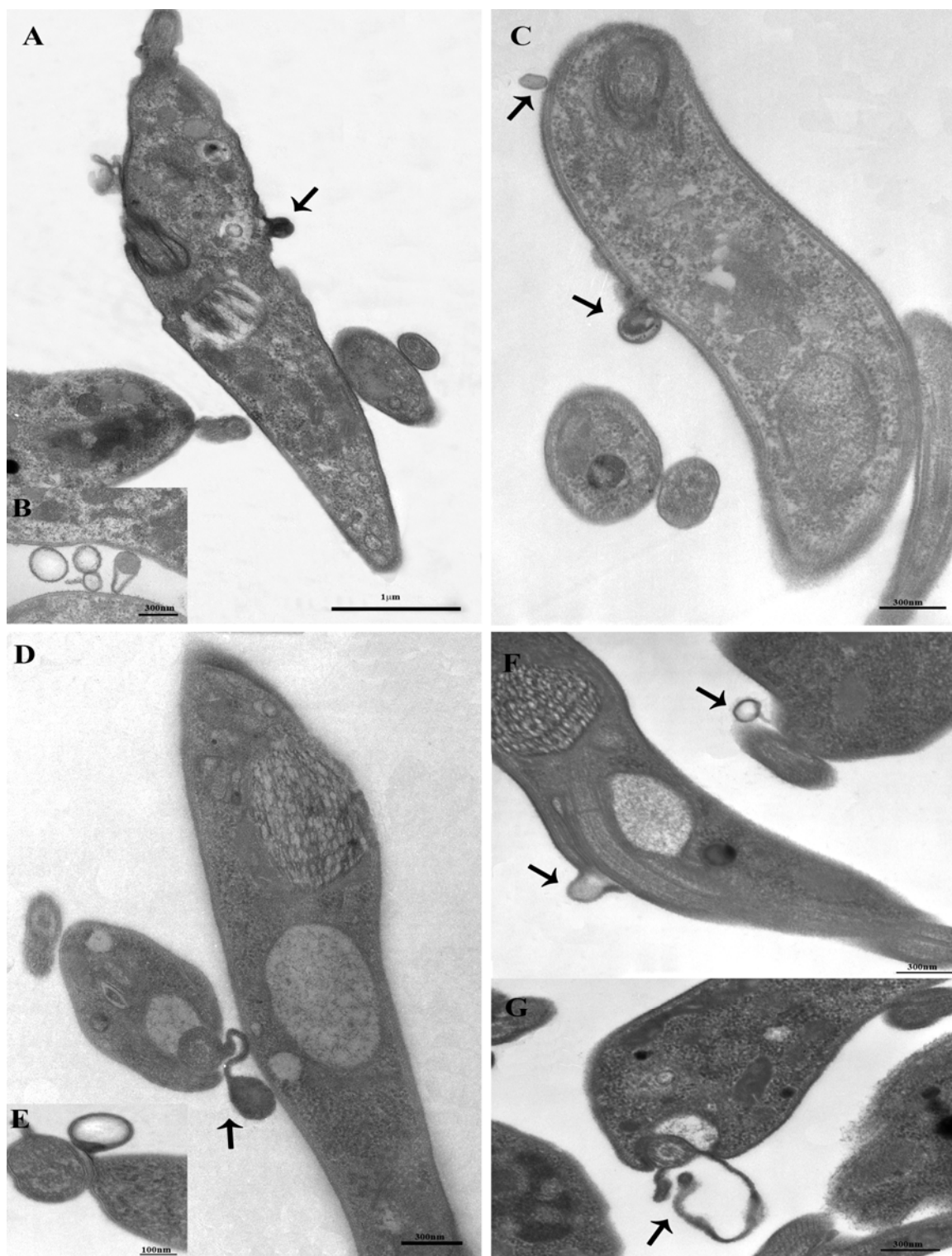
A análise ultraestrutural dos parasitos tratados com PMA de ambas as amostras, por MET, não mostrou diferenças significativas na quantidade de vesículas liberadas (Fig. 21).



**Figura 19 – Análise quantitativa da influência do PMA no processo de shedding em formas tripomastigotas do *T. cruzi*.** O sobrenadante total, obtido dos parasitos pertencentes ao clone CL-Brener, tratados com PMA (100 ng/ml) por 1 h a 37°C não apresentam diferenças significativas das proteínas liberadas pelo controle. Tais diferenças podem ser observadas no sobrenadante obtido da cepa Y, possuindo 13% a mais de proteínas naqueles submetidos ao tratamento. Dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ )



**Figura 20 - Detecção de proteínas do extrato (A) e sobrenadante totais (B) das formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener por SDS-PAGE (12%), coradas com Nitrato de Prata na presença e ausência do PMA. Extrato total dos tripomastigotas pertencentes à cepa Y e ao clone CL-Brener (A) não apresentam diferenças nas proteínas expressas entre o controle e o tratado, entretanto observamos no perfil protéico do sobrenadante total obtido da cepa Y após o tratamento do PMA uma maior liberação de proteínas em relação ao controle. Tal variação não foi observada no sobrenadante do clone CL-Brener (B). C, controle; T, tratado.**



**Figura 21 – Influência do PMA no shedding de vesículas de membrana das formas tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Y(A-C) e do clone CL-Brener (D-G).** Tripomastigotas vivos da cepa Y (A-B) e do clone CL-Brener (D-E) foram incubados por 1hora a 37°C em HBSS sem soro na ausência e presença de 100ng/mL de PMA (C; F-G). No controle da cepa Y, observamos vesículas brotando da superfície celular do parasito (**seta em A**), sendo detectadas, também, aderidas no corpo celular (**B**). Nas amostras tratadas com PMA da não observamos diferenças quanto a liberação de vesículas quando comparados com o controle, mostrando que o PMA aparentemente, não está envolvido no shedding de vesículas de membrana desses parasitos (C). No controle dos tripomastigotas do clone CL-Brener (D-E) detectamos a formação de vesículas na região do flagelo (E). Nessa mesma região observamos protrusões de membrana (**seta em D**). Quando tratados, observamos vesículas brotando a partir da membrana plasmática e no flagelo (**setas em F**). Protrusões do tipo filopódia também são detectadas assim como observamos no controle (G).

## 5. DISCUSSÃO

---

Durante o curso das doenças parasitárias, na medida em que os hospedeiros e parasitos evoluem para coexistirem, observa-se o desenvolvimento de mecanismos de escape ao sistema imunológico, principalmente naqueles que são parasitos intracelulares obrigatórios, como no caso do *T. cruzi* (LEIRIÃO *et al.*, 2004). Como por exemplo, podemos citar a modulação da superfície celular (MIRANDA-SANTOS & CAMPOS NETO, 1995). Devido à fluidez da membrana plasmática, os componentes de membrana se mobilizam lateralmente no plano desta, podendo formar agregados de proteínas em algumas regiões da superfície celular, processo conhecido como “capping” (NICOLSON, 1976) e tais agregados podem ser endocitados ou liberados através do “shedding” (DOYLE *et al.*, 1974).

Em espécies do gênero de *Leishmania* mostrou-se o “capping” de imunocomplexos em formas promastigotas, quando incubadas com anticorpos de cobaias infectadas (DOYLE *et al.*, 1974) e o “capping” e o “shedding” de sítios aniônicos desse parasito na presença da ferritina cationizada (FC) (SARAIVA *et al.*, 1989). Tanto o “capping” como o “shedding” já foram descritos nas formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, *in vitro* (LEON *et al.*, 1979; SZARFMAN *et al.*, 1980; SCHMUÑIS *et al.*, 1980; GONÇALVES *et al.*, 1991; BARROS *et al.*, 1996), na presença de imunoglobulinas de pacientes chagásicos ou de camundongos infectados (SCHUMUÑIZ *et al.*, 1978, 1980) e da lectina Concanavalina A (ConA) (SZARFMAN *et al.*, 1980). Estudos anteriores mostraram que a cepa Y rapidamente induz o “capping” e o “shedding” de suas moléculas de superfície, diferentemente ao observado na cepa CL (DE SOUZA, 1984). Acredita-se que no *T. cruzi* esses agregados, formados a partir da superfície do parasito, sejam eliminados através do mecanismo de “shedding” e que este possa ocorrer espontaneamente, embora em níveis diferentes, dependendo do antígeno, ou ainda que possa ser estimulado na presença de algumas substâncias ou moléculas (GONÇALVES *et al.*, 1991).

A capacidade de aglutinação na presença de lectinas e a influência de diferentes resíduos de açúcar na interação com células hospedeiras são distintas entre diversas cepas (PEREIRA *et al.*, 1980). Muitas das propriedades da superfície celular do parasito, como imunogenicidade, reconhecimento de sinais extracelulares e adesão estão vinculados direta ou indiretamente ao glicocálice (MARTINEZ-PALOMO, 1970; LUFT, 1976). Devido à importância dessas moléculas na interação parasito-hospedeiro, decidimos analisar, comparativamente, em formas tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener do *T. cruzi*, se o parasito modula sítios aniônicos e de manose, presentes na sua superfície, e como isso ocorre nas diferentes amostras.

Utilizamos, como controle para a localização dos sítios ligantes de FC e ConA, parasitos pré-fixados, partindo do princípio de que a fixação química com o glutaraldeído, em condições estabelecidas há muitos anos no laboratório, guarda as condições de ligação no momento de adição do fixador e que a velocidade de fixação é suficiente para manter a distribuição dos sítios de superfície na ausência do estímulo. Com este tipo de abordagem, observamos que a ligação da FC à superfície dos tripomastigotas é bem diferente nas duas amostras utilizadas neste estudo. Os parasitos da cepa Y exibem sempre agregados de partículas, sendo estas, assim como vesículas marcadas com FC, liberadas das membranas; aparentemente as partículas e vesículas não estavam previamente associadas às membranas. Em tripomastigotas do clone CL-Brener, observamos vesículas marcadas e não marcadas com FC e ausência de grumos. De alguma forma, os parasitos do clone CL-Brener liberam os sítios receptores de FC somente associados a membranas e regulam a liberação de vesículas de membrana com diferentes composições.

A incubação dos tripomastigotas vivos na presença de FC a 4°C mostrou que parasitos da cepa Y apresentaram agregados de partículas de FC na mesma região do corpo observada no controle, enquanto os parasitos do clone CL-Brener mantêm a sua marcação de superfície uniforme, indicando uma diferença na mobilidade dos sítios de ligação de FC entre as duas amostras, à baixa temperatura. Quando a temperatura é elevada, restaurando as condições normais de fluidez da membrana, notamos que os tripomastigotas da cepa Y mostram um perfil de “shedding” bem mais intenso, apresentando uma maior quantidade de vesículas marcadas e agregados sendo liberados na porção posterior do corpo. No CL-Brener pouca modificação é observada. Eventualmente aparecem poucas vesículas marcadas sendo liberadas. O comportamento das formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y é muito semelhante ao observado em formas promastigotas de *Leishmania mexicana amazonensis* (SARAIVA *et al.*, 1989).

O que estes experimentos podem mostrar em relação ao comportamento do parasito *in vivo*?

Ferritina cationizada é utilizada de rotina em técnicas citoquímicas para a detecção de cargas negativas na superfície de diferentes tipos celulares. O fato da incubação na presença da FC ser feita a pH fisiológico propicia o seu uso em células vivas. No *T. cruzi*, a FC que se liga à superfície das diferentes formas evolutivas o faz na quase totalidade sobre resíduos de ácido siálico, tendo em vista que o tratamento com neuraminidase praticamente abole a sua ligação (SOUTO-PADRÓN & DE SOUZA, 1984, 1986). A presença de ácido siálico é importante, não só para a carga de superfície em si, refletindo no processo de reconhecimento entre

células e substratos e/ou outras células (ARAÚJO-JORGE & DE SOUZA, 1982,1984), como na proteção do *T. cruzi* contra a lise mediada por complemento (KIPNIS *et al.*, 1981).

O que temos, então, é que os tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener modulam, de maneira diferente, o ácido siálico de superfície. Os parasitos da cepa Y tentam remover os resíduos ocupados pela proteína catiônica, descaracterizando a superfície e a expondo à ligação de outras moléculas. Os parasitos do clone CL-Brener não descartam de maneira tão intensa os sítios ocupados pela FC. A observação deste processo ao microscópio corrobora observações prévias obtidas por Krettl & col. (1979) e por Kipnis & col. (1981) em relação à resistência à lise pelo complemento. A remoção de ácido siálico provoca a lise de tripomastigotas pelo sistema complemento (KIPNIS *et al.*, 1981). Tripomastigotas da cepa CL não são lisados por soro humano normal, enquanto os da cepa Y o são, indicando que os componentes da via alternada do complemento não atuam da mesma maneira sobre as duas amostras (KRETTLI *et al.* 1979).

A utilização da ferritina cationizada em parasitos vivos vem ao encontro de outra característica observada *in vivo*: a ação das defensinas, que são peptídeos catiônicos ricos em cisteína, produzidos pelos leucócitos e células epiteliais, sendo importantes na imunidade inata contra alguns micróbios. O reconhecimento pela defensina  $\alpha$ -1 de humanos causa a formação de poros de membrana e induz a fragmentação do DNA, levando à destruição dos tripanossomas (MADISON *et al.*, 2007). Como tripomastigotas pertencentes à cepa Y perdem sítios aniônicos mais intensamente, quando comparados aos do clone CL-Brener, isso poderia facilitar a ligação das defensinas sobre os parasitos da cepa Y, facilitando o processo de lise.

Quando analisamos a ligação de ConA em parasitos pré-fixados, não observamos diferenças no padrão de distribuição dos sítios de ligação da lectina entre os parasitos das duas amostras, embora a análise por citometria de fluxo indique uma maior intensidade de marcação nos parasitos do clone CL-Brener. A incubação de parasitos a 4°C mostrou características bem distintas em relação às duas amostras. Os parasitos da cepa Y permanecem com os sítios de ligação distribuídos por todo o corpo ou sendo liberados em vesículas. A intensidade de ligação em relação ao material pré-fixado é bem inferior, tanto quando analisamos por citometria de fluxo, quando observamos ao MET. Nos parasitos do clone CL-Brener, a intensidade é ainda menor do que a observada no material pré-fixado e observamos uma redistribuição dos mesmos sítios para a região de adesão flagelo-corpo e para o interior da bolsa flagelar, local este que raríssimas vezes aparece marcado em parasitos controle. A incubação adicional a 37°C intensifica a liberação de sítios dos parasitos da cepa Y, com uma redução de 13% na intensidade de fluorescência e mostra um comportamento

oposto do CL-Brener, que permanece com os mesmos níveis de fluorescência e a mesma distribuição de sítios nas análises por microscopia eletrônica.

Dois fatos importantes na biologia do *T. cruzi* podem ser explicados pelo comportamento dos sítios de ligação com a ConA: a) o maior reconhecimento da cepa CL por cardiomiócitos e b) a resistência ao sistema complemento.

Em relação ao tropismo, estudos prévios mostraram que diferentes cepas possuem comportamentos distintos frente a diferentes tipos celulares e que, para o *T. cruzi*, a cepa Y é considerada um modelo de cepa macrófagotrópica (tropismo para células de linhagem macrófágica), enquanto a cepa CL é considerada miotrópica (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 1986). Além disso, receptores de manose em cardiomiócitos estão envolvidos no processo de invasão dessas células (SOEIRO *et al.*, 1999). Observando, novamente, as nossas imagens da ligação de ConA-ouro coloidal, vemos que os parasitos da cepa Y liberam vesículas contendo manose para o meio extracelular. Aqui podemos fazer duas considerações: 1) que constitutivamente fazem este processo – logo, vesículas de membrana contendo manose se ligariam na superfície do cardiomiócito, modulando negativamente a ligação com o tripomastigota; ou 2) que a ligação com a célula, via o receptor para manose, dispararia o brotamento de vesículas, assim como acontece com a ConA, fazendo com que o parasito reconhecido pudesse se soltar ou que as vesículas liberadas por este parasito modulassem negativamente a ligação de outros tripomastigotas. No caso dos parasitos do clone CL-Brener, que perdem uma quantidade muito menor de resíduos de manose (visto pela citometria de fluxo) e que redistribuem seus sítios para a região da bolsa flagelar, acreditamos que a presença dos sítios, ainda que nesta região, sejam suficientes para garantir a ligação dos parasitos à célula hospedeira. Devemos lembrar, também, que a adesão de tripomastigotas a células hospedeiras é, na grande maioria das vezes, feita através da região posterior do corpo do parasito, onde se encontra a saída da bolsa flagelar. O mesmo padrão de distribuição de resíduos de manose em Y e CL-Brener seria responsável pelo maior reconhecimento dos parasitos da cepa Y por macrófagos, onde a invasão se dá primordialmente por fagocitose, o que pressupõe a distribuição homogênea de sítios de reconhecimento pela superfície da célula a ser fagocitada.

Em relação à resistência ao complemento, os dados nos levam a pensar que *in vivo*, os efeitos aqui mostrados com a ConA poderiam ser provocados pelas proteínas ligadoras de manose (mannose-binding lectin – MBL ou mannose-binding proteins - MBPs). A ligação da MBL à célula alvo provoca o disparo da cascata do complemento (TAKAHASHI *et al.*, 2006). O recrutamento dos sítios de ligação de ConA nos parasitos do clone CL-Brener poderia evitar a lise, através desta via do sistema complemento. Os dados em relação ao clone CL-Brener são corroborados por estudos prévios, em que MBP se ligam fortemente a amastigotas da cepa CL



sub-clone 3 e não a tripomastigotas da mesma amostra e que a ligação aos amastigotas facilita sua fagocitose por células fagocíticas profissionais (KAHN *et al.*, 1995, 1996).

Unindo as duas moléculas encontradas *in vivo* podemos dizer que a lise dos parasitos da cepa Y é maior, porque as defensas se ligam sobre a superfície do parasito, que libera por “shedding” parte da sua superfície, facilitando a ligação das MBPs.

Analisamos, também, a influência da ligação de proteínas catiônicas e lectinas sobre o reconhecimento de tripomastigotas pelo anticorpo anti- $\alpha$ -gal. É sabido que este anticorpo está presente em grandes quantidades no soro de pacientes chagásicos crônicos, que se liga com grande afinidade a oligossacarídeos *O*-ligados de glicoproteínas do tipo mucinas de tripomastigotas e que aglutina e destrói tripomastigotas de cultura, de forma independente de complemento (ALMEIDA *et al.*, 1993, 1994a, 1994b, GAZZINELLI *et al.*, 1991). A lise pelo anticorpo anti- $\alpha$ -gal está intimamente relacionada ao grau de sialização da superfície de tripomastigotas e, na ausência do ácido siálico, a agregação das mucinas pelo anticorpo causaria danos irreversíveis à superfície do parasito e, finalmente, sua lise (PEREIRA-CHIOCCOLA *et al.*, 2000). O primeiro fato que observamos é que tripomastigotas da cepa Y ligam mais anti- $\alpha$ -gal do que os do clone CL-Brener, o que explicaria a menor percentagem de parasitos móveis na cepa Y. A seguir, observamos que o tratamento com FC provoca uma diminuição acentuada da ligação do anti- $\alpha$ -gal (queda na intensidade de fluorescência) e, conseqüentemente, uma maior sobrevivência dos parasitos, principalmente na cepa Y. A diminuição da ligação com o anticorpo possivelmente se deve ao “shedding” de cargas negativas da superfície dos tripomastigotas, muito provavelmente as mucinas reconhecidas pelo anti- $\alpha$ -gal. No caso dos parasitos do clone CL-Brener, a aparente impossibilidade de descartar os sítios de ligação com a FC levaria a uma impossibilidade conformacional para a ligação do anticorpo anti- $\alpha$ -gal. Na presença de ConA, verificamos um comportamento distinto entre as duas amostras. Parasitos da cepa Y ligam menos anti- $\alpha$ -gal e aumentam sua taxa de sobrevivência pela lise com o anticorpo, provavelmente como descrito para a FC por sua alta taxa de “shedding”. Já os parasitos do clone CL-Brener apresentam uma maior taxa de ligação com o anticorpo (aumento na intensidade de fluorescência em relação ao controle) e um aumento discreto na percentagem de parasitos lisados que, estatisticamente, não foi significativa. Uma vez que a ligação com a ConA provoca uma redistribuição acentuada de moléculas na membrana dos tripomastigotas, este fato também poderia levar a uma impossibilidade de ação do anticorpo anti- $\alpha$ -gal.

Como citamos anteriormente, a ação de moléculas semelhantes na natureza poderia provocar os mesmos efeitos observados com a FC e a ConA, reforçando os dados já conhecidos de maior resistência dos parasitos da cepa CL em relação à lise pelo sistema

complemento. Mesmo assim, este estudo apenas mostra mais uma estratégia utilizada pelo parasito e a variabilidade de comportamento entre diferentes cepas.

Um caminho natural a seguir seria o da análise e comparação do material que é liberado pelos parasitos das duas amostras de *T. cruzi* que utilizamos como modelo experimental. Iniciamos, então, a identificação e comparação do material liberado no meio de cultura pelos parasitos das suas amostras de *T. cruzi*, além de uma análise sobre as possíveis vias de sinalização intracelular que estariam, ou não, agindo no processo de “shedding” desses parasitos. Na infecção pelo *T. cruzi*, o “shedding” de componentes de membrana tem sido apontado como responsável pela presença de antígenos do parasito em tecidos e órgãos, nos quais os parasitos intracelulares não são visualizados ou sobre células não infectadas na fase crônica da doença de Chagas (RIBEIRO DOS SANTOS & HUDSON, 1980; BEN YOUNES *et al.*, 1988), pela presença de antígenos circulantes (exoantígenos) no soro, nos rins e na urina de animais infectados e de pacientes nas fases aguda e crônica da doença de Chagas e por alterações morfológicas e imunológicas detectadas em rim de camundongos infectados pelo *T. cruzi* (CASTRO & RIBEIRO DOS SANTOS, 1977).

No nosso trabalho, para o ensaio de “shedding”, não utilizamos o soro fetal bovino, apesar de sabermos que o soro fetal bovino é capaz de estimular fortemente o “shedding” de vesículas (DOLO *et al.*, 1994; CASSARA *et al.*, 1998). O soro fetal bovino possui exossomos (OCHIENG *et al.*, 2009), que seriam invariavelmente isolados juntamente com as vesículas do parasito, prejudicando as análises bioquímicas e estruturais do material obtido dos parasitos.

Observamos que tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener liberam quantidade semelhantes de proteínas no meio e que as proteínas liberadas apresentam o mesmo padrão de bandas, com massas moleculares entre 25 a 110 kDa. Nosso resultado é um pouco diferente do observado anteriormente por Gonçalves e col. (1991) que detectaram polipeptídeos liberados pelas formas tripomastigotas da cepa Y variando de 70 a 150 kDa.

No sobrenadante de ambas as amostras do *T. cruzi*, observamos uma proteína com massa molecular aparente de 85kDa, que inferimos ser a glicoproteína de superfície da superfamília trans-sialidases TC-85, encontradas nas formas tripomastigotas de cultura do *T. cruzi*, que estão envolvidas no reconhecimento das células hospedeira, permitindo a interação com diferentes receptores da célula e com a matriz extracelular (ALVES *et al.*, 1986; MING *et al.*, 1993; GIORDANO *et al.* 1994). Relatos anteriores demonstraram o “shedding” dessa proteína associada a vesículas (GONÇALVES *et al.*, 1991), sendo a proteína rapidamente liberada para o meio extracelular (ABUIN, COLLI & ALVES, 1996). Além disso, esta proteína, bem como outras na faixa de massa molecular de 85-110 kDa foram encontradas em células não infectadas, sendo internalizadas por essas células. A absorção dos antígenos liberados pelo *T. cruzi*

sensibiliza as células hospedeiras, induzindo a expressão dos componentes da matriz extracelular, contribuindo no estabelecimento da inflamação (PINHO *et al.*, 2002).

A análise da atividade proteolítica, presente no material liberado durante a incubação em meio sem soro, mostrou que a pH 5.5 (condições preferenciais para cisteino proteínases) os parasitos da cepa Y apresentaram a expressão de 2 bandas de 38 kDa e 44 kDa, enquanto que no clone CL-Brener, observamos apenas a protease de 44 kDa. Como as atividades foram inibidas por E-64, isto é indicativo da presença de cisteino proteínases. A identificação das proteínas por *Western-blotting* está em andamento.

Devido à importância da metaloprotease no processo de “shedding” (SCHLÖNDORFF & BLOBEL, 1999; DELLA SBARBA & ROVIDA, 2002), decidimos verificar se, no sobrenadante obtido após a incubação dos parasitos, esta atividade estaria presente. Apesar de não termos conseguido, ainda, a inibição dessas proteases, sabemos que a incubação em tampão glicina pH 10 favorece a atividade de serina e metaloprotease. No sobrenadante total de ambas as amostras observa-se a expressão da protease de 52 kDa. Entretanto, essa liberação para o meio extracelular ocorre mais intensamente, cerca de 50% a mais nos parasitos da cepa Y, em comparação ao clone CL-Brener. Acreditamos que a protease de 52 kDa seja aquela identificada recentemente como sendo a gp63 do *T. cruzi* (KULKARNI *et al.*, 2009). Sabe-se que no gênero *Leishmania*, a gp63 (glicoproteína de superfície de 60-65 kDa, ancorada à membrana por uma âncora de GPI com atividade de metaloproteínase) (BORDIER *et al.*, 1986, 1987) é responsável pelo aumento da infectividade das formas promastigotas no hospedeiro mamífero, resistência ao complemento, virulência e sobrevivência do parasito, sendo liberada para o meio extracelular através do processo de “shedding” (JAFLE & DWYER, 2003). Esta liberação de vesículas pelo *T. cruzi* contendo metaloproteases poderia provocar os mesmos efeitos, já descritos em células tumorais, cujas metaloproteases presentes em vesículas de membrana liberadas provocam a degradação da matriz extracelular, promovendo a invasão tecidual e metástase (DOLO *et al.* 1999). Ainda não possuímos dados da atividade enzimática nas vesículas isoladas.

Iniciamos, também, a análise de uma outra via de liberação de proteínas de superfície, a do “shedding” de ectodomínios. A liberação de proteínas solúveis por esse mecanismo envolve vias de sinalização intracelular e proteína cinase C (KIESSLING & GORDON, 1998). Baseados nestes dados testamos a influência do PMA no “shedding” em *T. cruzi*. Observamos, através da análise por eletroforese em SDS-PAGE, apenas em tripomastigotas pertencentes à cepa Y, que a grande maioria das bandas observadas, após o tratamento com PMA, apresentou sua expressão aumentada, em relação ao controle, o que foi confirmado pela análise densitométrica, o que não ocorreu com parasitos do clone CL-Brener.

A análise ultraestrutural dos parasitos de ambas as amostras do *T. cruzi*, incubados com PMA, não apresentou diferenças quanto à liberação de perfis de membrana por esses parasitos, quando comparados com o controle. Além disso, observamos em alguns parasitos, no flagelo das formas tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener, projeções do tipo filopódia, corroborando com os dados observados por Carvalho & De Souza (1987). Sendo assim, é possível que a maior liberação das proteínas detectadas no sobrenadante obtido após ensaio de “shedding”, na presença do PMA, e nas formas tripomastigotas pertencentes à cepa Y do *T. cruzi*, esteja ocorrendo devido à liberação de proteínas de ectodomínios, pelo processo de “shedding”, e que na cepa Y este processo tenha, como parte de sua sinalização, a ativação de PKC. Ainda não sabemos a participação de cinases na ativação do “shedding” no clone CL-Brener.

### **Conclusões:**

Os dados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- a) A presença da FC é capaz de induzir o “shedding” em tripomastigotas vivos da cepa Y já a 4°C, enquanto que no clone CL-Brener, isso só ocorre a 37°C, ainda assim não sendo tão intenso esse processo.
- b) A presença de ConA induz o “shedding” em tripomastigotas do clone CL-Brener a 4°C, enquanto nos parasitos da cepa Y observamos ocorrer a 37°C.
- c) Tripomastigotas da cepa Y se ligam mais ao anticorpo anti- $\alpha$ -gal do que os do clone CL-Brener.
- d) Parasitos da cepa Y são mais susceptíveis à lise pelo anticorpo Ch anti- $\alpha$ -gal, quando comparados ao clone CL-Brener.
- e) A pré-incubação com FC e ConA e, posteriormente com Ch anti- $\alpha$ -gal, protege tripomastigotas da cepa Y da lise por este anticorpo, diferentemente ao observado no clone CL-Brener.
- f) Tripomastigotas da cepa Y e do clone CL-Brener não apresentam diferenças qualitativas e quantitativas quanto à liberação de proteínas, após a incubação com meio sem soro.

g) Em pH 5.5 observamos uma maior atividade proteolítica no sobrenadante, obtido após ensaio de “shedding”, em parasitos da cepa Y do que no clone CL-Brener. Em pH 10, observamos que ambos os parasitos liberam as mesmas proteases, apesar da intensidade ser maior em tripomastigotas da cepa Y.

h) Na regulação do processo de “shedding”, a ativação da proteína cinase C se mostrou importante nos tripomastigotas da cepa Y.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABUIN, G.; COLLI, W.; ALVES, M.J. **Turnover and shedding of the Tc-85 surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes.** Braz. J. Med. Biol. Res., 29(3):335-341, 1996.

ABUIN, G.; COUTO, A.S.; DE LEDERKREMER, R.M.; CASAL, O.L.; GALLI, C.; COLLI, W.; ALVES, M.J. ***Trypanosoma cruzi*: the Tc-85 surface glycoprotein shed by trypomastigotes bears a modified glycosylphosphatidylinositol anchor.** Exp Parasitol., 82, 290-297, 1996.

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

ALKARMI, T.O.; ALSHAKARCHI, Z.; BEHBEHANI, K. ***Echinococcus multilocularis*: the non-specific binding of different species of immunoglobulins to alverolar hydatid cysts grown in vivo and in vitro.** Parasite Immunol., 10, 443-457, 1988.

ALMEIDA, I.C.; KRAUTZ, G.M.; KRETTLI, A.U.; TRAVASSOS, L.R. **Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kDa antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease.** J. Clin. Lab. Anal., 7(6), 307-316, 1993.

ALMEIDA, I.C.; FERGUSON, M.A.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L.R. **Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*.** Biochem. J., 15, 793-802, 1994.

ALMEIDA, I. C.; FERGUSON, M.A.J.; SCHENKMAN, S.; TRAVASSOS, L.R.; **GPI-anchored glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes are recognized by lytic anti-alpha-galactosyl antibodies isolated from patients with chronic Chagas' disease.** Braz. J. Med. Biol. Res., 27(2), 443-447, 1994.

ALVES, M.J.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V.Y.; COLLI, W. **Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi***. Mol. Biochem. Parasitol.,21(1):75-82, 1986.

ANDRADE, L.O. & ANDREWS, N.W. **Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells**. J. Exp. Med., 200(9), 1135-43, 2004.

ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. **The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention**. Nat. Rev. Microbiol., 3(10), 819-23, 2005.

ANDREWS, N.W & WHITLOW, M.B. **Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH**. Mol. Biochem. Parasitol.,33(3), 249-56, 1989.

ANDREWS, N.W., ROBBINS, E.S., LEY, V., HONG, K.S., NUSSENZWEIG, V. **Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of *Trypanosoma cruzi***. J. Exp. Med., 167, 300-14, 1988.

ANDREWS, N.W.; ABRAMS, C.K.; SLATIN, S.L.; GRIFFITHS, G. A **T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH**. Cell., 61(7), 1277-1287, 1990.

ANDREWS, N.W. **From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi***. Braz. J. Med. Biol. Res., 27(2), 471-475,1994

ANNABI, B.; PILORGET, A.; BOUSQUET-GAGNON, N.; GINGRAS, D.; BÉLIVEAU, R. **Calmodulin inhibitors trigger the proteolytic processing of membrane type-1 matrix metalloproteinase, but not its shedding in glioblastoma cells**. Biochem. J., 15,325-333,2001.

APARÍCIO, I.M.; SCHARFSTEIN, J. & LIMA, A.P.C.A. **A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigotes membranes**. Infect. Imm., 72, 5892-5902, 2004.

ARAÚJO, F.G. **Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* bu enzyme immunoassay**. Ann. Trop. Med. Parasitol., 76, 25-36,1982.

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

ARAÚJO JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S.; MOREIRA, A.L.; DE SOUZA, W.; MEIRELLES, M.N. **The interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with myoblasts and fibers of skeletal muscle.** Z. Parasitenkd., 72(5), 577-584, 1986.

ARAÚJO JORGE, T.C. & DE SOUZA, W. **Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages.** Acta Trop., 41(1), 17-28, 1984.

ASHALL, F. **Characterisation of an alkaline peptidase of *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids.** Mol. Biochem. Parasitol., 38(1), 77-87, 1990.

BANGS, J.D., RANSON, D.A., NIMICK, M., CHRISTIE, G., HOOPER, N.M. **In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors.** Mol. Biochem. Parasitol., 114, 111-117, 2001.

BARRET, A.J. **Classification of peptidases.** Meth. Enzymol., 244, 1-15, 1994.

BARRET, A. J., RAWLINGS, N.D. & O'BRIEN, E.A. **The MEROPS database as a protease information system.** J. Struct. Biol., 134, 95-102, 2001.

BARROS, H.C.; DA SILVA, S.; VERBISCK, N.V.; ARAGUTH, M.F.; TEDESCO, R.C.; PROCÓPIO, D.O.; MORTARA, R.A. **Release of membrane-bound trails by *Trypanosoma cruzi* amastigotes onto modified surfaces and mammalian cells.** J. Eukaryot. Microbiol., 43(4), 275-285, 1996.

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

BASTOS, I.M.; GRELLIER, P.; MARTINS, N.F.; CADAVID-RESTREPO, G.; DE SOUZA-AULT, M.R.; AUGUSTYNS, K.; TEIXEIRA, A.R.; SCHRÉVEL, J.; MAIGRET, B.; DA SILVEIRA, J.F.; SANTANA, J.M. **Molecular, functional and structural properties of the**



**prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells.** Biochem. J., 388(1), 29-38, 2005.

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

BEHNKE, O. **Surface membrane clearing of receptor-ligand complexes in human blood platelets.** J. Cell. Sci., 87, 465-472, 1987.

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

BHATTACHARYA, J.; DEY, R. & DATTA, S.C. **Calcium dependent thiol protease caldonopain and its specific endogenous inhibitor in *Leishmania donovani*.** Mol. Cell Biochem., 126(1), 9-16, 1993.

BIANCO, F.; PRAVETTONI, E.; COLOMBO, A.; SCHENK, U.; MÖLLER, T.; MATTEOLI, M.; VERDERIO, C.; **Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1- $\beta$  release from microglia.** J. Immunol., 174, 7268-7277, 2005.

BLACK, R.A.; WHITE, J.M. **ADAMs: focus on the protease domain.** Curr. Opin. Cell Biol., 10, 654-659, 1998.

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

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. **How do protozoan parasites survive inside macrophages.** Parasitol. Today, 15(1), 22-8, 1999.

BONALDO, M.C.; D'ESCOFFIER, L.N.; SALLES, J.M.; GOLDENBERG, S. **Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis.** Exp. Parasitol., 73, 44-51, 1991.

- BONGERTZ, V.; HUNGERER, L.; GALVÃO-CASTRO, B. ***Trypanosoma cruzi*: circulating antigens**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 76, 71-82, 1981.
- BORDIER, C.; ETGES, R.J.; WARD, J.; TURNER, M.J.; CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. ***Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycopospholipid membrane anchor**. Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 5988-5991, 1986.
- BORDIER, C. **The promastigota surface protease of *Leishmania***. Parasitol. Today, 5, 151-153, 1987.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. An. Biochem. 7, 72:248-254, 1976.
- BRANQUINHA, M.H.; VERMELHO, A.B.; GOLDENBERG, S.; BONALDO, M.C. **Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids**. J. Eukaryot. Microbiol., 43(2), 131-135, 1996.
- BRENER, Z.; ALVARENGA, N.J. **Life cycle of *T. cruzi* in the vector**. In **American Trypanosomiasis Research**. PAHO. Sci. Public., 318, 83-88, 1976.
- BRENER, Z. **Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi***. Ann. Trop. Med. Parasitol., 59, 19-26, 1965.
- BRENER, Z. **Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics**. PAHO. Sci. Pub., 347, 11-21, 1977.
- BRENER, Z. **Immunity to *Trypanosoma cruzi***. Adv. Parasitol., 18, 247-292, 1980.
- BRICKER, B.J.; TABATABAI, L.B.; MAYFIELD, J.E. **Immunoglobulin G binding activity of *Brucella abortus***. Mol. Immunol., 28, 35-9, 1991.
- BULLOW, R., NONNENGASSER, C. & OVERATH, P. **Release of the variant surface glycoprotein during differentiation of bloodstream to procyclic forms of *Trypanosoma brucei***. Mol. Bioch. Parasitol., 32, 85-92, 1989.

BURLEIGH, B.A. & WOOLSEY, A.M. **Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion.** Cell. Microbiol., 4(11), 701-711, 2002.

BUTMAN, B.T.; BOURGUIGNON, G.J.; BOURGUIGNON, L.Y. **Lymphocyte capping induced by polycationized ferritin.** J. Cell. Physiol., 105, 7-15, 1980.

CALDERÓN, J. **Dynamic changes on the surface of *Entamoeba* induced by antibodies.** Arch. Invest. Med. (Mex)., 11, 55-61, 1980.

CAMARGO, M.M.; ALMEIDA, I.C.; PEREIRA, M.E.; FERGUSON, M.A.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. **Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages.** J. Immunol., 158(12), 5890-5901, 1997.

CAMARGO, E.P.; ITOW, S.; ALFIERI, S.C. **Proteolytic activities in cell extracts of trypanosomatids.** J. Parasitol., 64(6), 1120-1121, 1978.

CAMPETELLA, O.; SÁNCHEZ, D.; CAZZULO, J.J.; FRASCH, A.C. **A superfamily of *Trypanosoma cruzi* surface antigens.** Parasitol. Today., 8(11), 378-381, 1992.

CAMUS, D.; ZALIS, M.G.; VANNIER-SANTOS, M.A.; BANIC, D.M. **The art of parasite survival.** Braz. J. Med. Biol. Res., 28(4), 399-413, 1995.

CAPRON, A. & DESSAINT, J.P. **Molecular basis of host-parasite relationship: towards the definition of protective antigens.** Immunol. Rev., 112, 27-48, 1989.

CARAFOLI, E. **The signaling function of calcium and its regulation.** J. Hypertens., 12(10), 47-56, 1994.

CARPENTER, G.; COHEN, S. **<sup>125</sup>I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts.** J. Cell. Biol., 71, 159-171, 1976.

CASSARA, D.; GINESTRA, A.; DOLO, V.; CARUSO, G.; LUCANIA, G. & VITTORELLI, M.L. **Modulation of vesicle shedding in 8701 BC human breast carcinoma cells.** J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 30, 45-53, 1998.

CASTRO, A.C.L.C.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. **Imunopatologia do rim na forma crônica da moléstia de Chagas experimental.** Rev. Goiana Med., 23, 1-13, 1977.

CARVALHO, T.U. & DE SOUZA, W. **Effect of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) on the fine structure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with activated and resident macrophages.** Parasitol. Res., 74(1), 11-17, 1987.

CIAVAGLIA, M.D.O. C.; DE CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W. **Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 193(2), 718-721, 1993.

CLAYTON, C.; HÄUSLER, T.; BLATTNER, J. **Protein trafficking in kinetoplastid protozoa.** Microbiol. Rev., 59(3), 325-344, 1995.

COLTEL, N.; COMBES, V.; WASSMER, S.C.; CHIMINI, G.; GRAU, G.E. **Cell vesiculation and immunopathology: implications in cerebral malaria.** Microbes. Infect., 8(8), 2305-2316, 2006.

COMFURIUS, P.; SENDEN, J.M.; TILLY, R.H.; SCHROIT, A.J.; BEVERS, E.M.; ZWAAL, R.F. **Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase.** Biochim. Biophys. Acta., 1026(2), 153-160, 1990.

CROSS GA **Antigenic variation in trypanosomes: secrets surface slowly.** Bioessays., 18(4), 283-291, 1996.

CUEVAS, I.C.; CAZZULO, J.J. & SÁNCHEZ, D.O. **gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection.** Infect. Immun., 71(10), 5739-5749, 2003.

CYBULSKY, A.V.; BONVENTRE, J.V.; QUIGG, R.J.; LIEBERTHAL, W.; SALANT, D.J. **Cytosolic calcium and protein kinase C reduce complement-mediated glomerular epithelial injury.** *Kidney. Int.*, 38(5), 803-811, 1990.

DAINIAK, N. **Surface membrane-associated regulation of cell assembly, differentiation, and growth.** *Blood*, 78, 264-276, 1991.

D'AVILA-LEVY, C. M.; MARINHO, F. A.; SANTOS, L. O.; MARTINS, J. L. M.; SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H. **Antileishmanial activity of MDL28170, a potent calpain inhibitor.** *Int. J. Antimicrobial Agents*, 28, 138–142, 2006.

DE SIQUEIRA, A.F.; FILHO, F.F.; RIBEIRO, R.D. **Early immunological aspects in rats infected by *Trypanosoma cruzi*. II. Soluble antigen circulation and the modifications of serum complement from animals in successive days of the infection.** *Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.*, 12, 75-9, 1979.

DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Int. Rev. Cytol.*, 86, 197-282, 1984.

DE SOUZA, W. **Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa.** *Micron.*, 26(5), 405-30, 1995.

DE SOUZA, W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Curr. Pharm. Des.*, 8(4), 269-283, 2002.

DE SOUZA, W. **Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole.** *Histochem. Cell. Biol.*, 123(1), 1-18, 2005.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N.L. **Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa.** *Prog. Histochem. Cytochem.*, 44(2), 67-124, 2009.

DE TITTO, E.H.; ARAÚJO, F.G. **Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease.** *Clin. Immunol. Immunopathol.* 46, 157-161, 1988.

DELLA SBARBA, P.; RODOVIDA, E. **Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding.** Biol. Chem., 383, 69-83, 2002.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S.N. **Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man.** Nat. Rev. Microbiol., 3(3), 251-261, 2005.

DOETSCHMAN, T.C. **The effects of Con A on cell surface shedding in cell cultures.** J. Cell. Sci., 46, 221-234, 1980.

DOLO, V. ; GINESTRA, A. ; GHERSI, G.; NAGASE, H.; VITTORELLI, M.L. **Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities.** J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 26, 173-180, 1994.

DOLO, V.; D'ASCENZO, S.; VIOLINI, S.; POMPUCCI, L.; FESTUCCIA, C.; GINESTRA, A.; VITTORELLI, M.L.; CANEVARI, S.; PAVAN, A. **Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro.** Clin. Exp. Metastasis, 17, 131-140, 1999.

DOWNING, J.R.; ROUSSEL, M.F.; SHERR, C.J. **Ligand and protein kinase-C down-modulate the colony-stimulating factor-1 receptor by independent mechanisms.** Mol. Cell. Biol., 9, 2890-2896, 1989.

DOYLE, J.J.; BEHIN, R. ; MANUEL, J.; ROWE, D.S.J. **Antibody-induced movement of membrane components of *Leishmania enriettii*.** J. Exp. Med., 139, 1061-1069, 1974.

DWYER, D.M. **Immunologic and fine structure evidence of avidly bound host serum proteins in the surface coat of a bloodstream trypanosome.** Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1222-1226, 1976.

DZBEŃSKI, T.H. **Exoantigens of *Trypanosoma cruzi* in vivo.** Tropenmed Parasitol., 25, 485-491, 1974.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** Nat. Rev. Cancer., 2, 161-174, 2002.

EHLERS, M.R.; SCHWAGER, S.L.; SCHOLLE, R.R.; MANJI, G.A.; BRANDT, W.F.; RIORDAN, J.F. **Proteolytic release of membrane-bound angiotensin-converting enzyme: role of the juxtamembrane stalk sequence.** *Biochemistry*, 35, 9549- 9559, 1996.

ENRIQUEZ, F.J.; BOGGAVARAPU, J.; BRADLEY-DUNLOP, D. **Presence of non-Fab IgE binding molecules in the intestinal nematode parasite of mice. *Heligmosomoides polygyrus*.** *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 99,123-126,1992.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. **Entamoeba histolytica: mechanism of surface receptor capping.** *Exp. Parasitol.*,79, 424-435, 1994.

ETGES, R.J.; BOUVIER, J. & BORDIER, C. **The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease.** *J. Biol. Chem.*, 261, 9099-9101, 1986.

FERGUSON, M.A. & CROSS, G.A. **Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein.** *J. Biol. Chem.*, 259(5), 3011-3015, 1984.

FIELD, M.C.; NATESAN, S.M.; GABERNET-CASTELLO, C.; KOUMANDOU V.L. **Intracellular Trafficking in the Trypanosomatids.** *Traffic*, 8, 629-639, 2007.

FONG, D. & CHANG, K.P. **Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79(23), 7366-7370, 1982.

FOX, J. E. B.; AUSTIN, C.D.; BOYLES, J.K.; STEFFEN, P.K. **Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane.** *J. Cell Biol.*,111, 483-493, 1990.

FOX, J. E. B.; AUSTIN, C.D.; REYNOLDS, C.C.; STEFFEN, P.K. **Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant containing microvesicles from the surface membrane of aggregating platelets.** *J.Biol. Chem.*, 266, 13289-13295 , 1991.

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

GARCIA, M.P.; NÓBREGA, O.T.; TEIXEIRA, A.R.L.; SOUZA, M.V.; SANTANA, J.M. **Characterisation of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease**. Mol. Biochem. Parasitol., 91, 263-272, 1998.

GARCIA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTEN, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P. **Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions**. J. Insect. Physiol., 53(1), 11-21, 2007.

GARZON, E.; GENNA, F.; BOSSENO, M.F.; SIMONY-LA FONTAINE, J.; RADAL, M.; SERENO, D.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A.; BRENIÈRE, S.F. **Differential infectivity and immunopathology in murine experimental infections by two natural clones belonging to the *Trypanosoma cruzi* I lineage**. Parasitology., 131(1), 109-119, 2005.

GAZZINELLI, R.T.; PEREIRA, M.E.; ROMANHA, A.; GAZZINELLI, G.; BRENER, Z. **Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies**. Parasite. Immunol., 13(4), 345-356, 1991.

GINESTRA, A.; MONEA, S.; SEGHEZZI, G.; DOLO, V.; NAGASE, H.; MIGNATTI, P.; VITTORELLI, M.L. **Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by Human HT1080 fibrosarcoma cells**. J. Biol. Chem., 272, 17216-17222, 1997.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; COLLI, W.; ALVES, M.J. **An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein**. Mol. Biochem. Parasitol., 65(1), 85-94, 1994.

GIRONÈS, N.; CUERVO, H.; FRESNO, M. ***Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease**. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 296, 89-123, 2005.



GITLER, C.; CALEF, E.; ROSENBERG, I. **Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica***. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 307, 73-85, 1984.

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

GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M. In: *Genes, Antigens and Parasites*, 106-107. Edited by Carlos Morel, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 1984.

GRAIG, P.S. **Surface-associated proteins and host IgG on early and late metacestode stages of *Taenia pisiformis***. *Parasite. Immunol.*, 10, 243-254, 1988

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I.M.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A.R.; SCHRÉVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J.M. ***Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes**. *J. Biol. Chem.*, 276(50), 47078-47086, 2001.

GRUPPI, A.; CERBÁN, F.M.; VOTTER-CIMA, E. **Exoantigens from *Trypanosoma cruzi* contain cruzipain**. *Acta Trop.*, 63, 141-149, 1997.

GRUSZYNSKI, A.E.; DEMASTER, A.; HOOPER, N.M.; BANGS, J.D. **Surface Coat Remodeling during Differentiation of *Trypanosoma brucei***. *J. Biol. Chem.*, 278, 24665–24672, 2003.

GUILLÉN, N.; BOQUET, P.; SANSONETTI, P. **The small GTP-binding protein RacG regulates uroid formation in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica***. *J. of Cell Scie.*, 111, 1729-1739, 1998.

GUPTA, S. **Parasite immune escape: new views into host–parasite interactions**. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 428–433, 2005.

GUTWEIN, P.; MECHTERSHEIMER, S.; RIEDLE, S.; SOTECK, A.; GAST, D.; JOUMAA, S.; ZENTGRAF, H.; FOGEL, M.; ALTEVOGT, P. **ADAM10-mediated cleavage**

**of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles.** Fasev J., 17, 292-294, 2002.

HERRERA, E.M.; MING, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M.E. **Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulfate receptors on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes.** Mol. Biochem. Parasitol., 65:73-83,1994.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. **Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates.** Anal. Biochem., 102(1), 196-202, 1980.

HORTA, M.F.; RAMALHO-PINTO, F.J. **Role of human decay-accelerating factor in the evasion of *Schistosoma mansoni* from the complement-mediated killing in vitro.** J Exp Med., 174, 1399-406, 1991.

INGLEY, E. **Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways.** Biochim. Biophys. Acta., 1784,:56-65,2008.

ISLAM, A.; JONES, H.; HIROI, T.; LAM, J.; ZHANG, J.; MOSS, J.; VAUGHAN, M.; LEVINE, S.J. **cAMP-dependent protein kinase A (PKA) signaling induces TNFR1 exosome-like vesicle release via anchoring of PKA regulatory subunit RIIbeta to BIG2.** J. Biol. Chem., 283,25364-25371,2008.

ITOW, S. & CAMARGO, E. P. **Proteolytic activites in cell extracts of *Trypanosoma cruzi*.** J. Protozool., 24(4), 591-595, 1977.

IZUMI, Y.; HIRATA, M.; HASUWA, H.; IWAMOTO, R.; UMATA,T. MIYADO,K.; TAMAI, Y.; KURISAKI, T.; SEHARA, F.A.; OHNO,S.; MEKADA, E. **A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor.** Embo J. 17, 7260-7272, 1998.

JAFLE, C.L. & DWYER, D.M. **Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids.** Parasitol. Res., 91(3), 229-237,. 2003.

JOINTER, K.A.; DIAS DA SILVA, W.; RIMOLDI, M.T.; HAMMER, C.H.; SHER, A.; KIPNIS, T.I. **Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases.** J. Biol. Chem., 263, 11327-11335, 1988.

JOYEAU, R.; MAOULIDA, C.; GUILLET, C.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A.R.; SCHRÉVEL, J.; SANTANA, J.; GRELLIER, P. **Synthesis and activity of pyrrolidinyl- and thiazolidinyl-dipeptide derivatives as inhibitors of the Tc80 prolyl oligopeptidase from *Trypanosoma cruzi*.** Eur. J. Med. Chem. 35(2), 257-266, 2000.

KAHN, S.J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R.A.; CODER, D.; ARUFFO, A.; FARR, A. **The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein.** Infect. Immun., 64(7), 2649-2656, 1996.

KAHN, S.; WLEKLINSKI, M.; ARUFFO, A.; FARR, A.; CODER, D.; KAHN, M. ***Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor.** J. Exp. Med., 182(5), 1243-1258, 1995.

KAJITA, M.; ITOH, Y.; CHIBA, T.; MORI, H.; OKADA, A.; KINOH, H.; SEIKI, M. **Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration.** J. Cell. Biol., 153(5), 893-904, 2001.

KALLINA, B.; MCMANUS, D.P. **Na IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with *Schistosoma paramyosin*.** Parasitology, 106, 289-296, 1993.

KIESSLING, L.L.; GORDON, E.J. **Transforming the cell surface through proteolysis.** Chem. Biol., 5,49-62,1998.

KIPNIS, T.L.; DAVID, J.R.; ALPER, C.A.; SHER, A.; DA SILVA, W.D. **Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages.** Proc. Natl. Acad. Sci., 78(1), 602-605, 1985.

KRAUS, S.; SEGER, R. & FISHELSON, Z. **Involvement of the ERK mitogen-activated protein kinase in cell resistance to complement-mediated lysis.** Clin. Exp. Immunol., 123(3), 366-374, 2001.

KRAUSS, S. & FISHELSON, Z. **Cell desensitization by sublytic C5b-9 complexes and calcium ionophores depends on activation of protein kinase C.** Eur. J. Immunol., 30(5), 1272-1280, 2000.

KRETTLI, A.U.; WEISZ-CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R.S. **Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis.** Clin. Exp. Immunol., 37(3), 416-423, 1979.

KRETTLI, A. & NUSSENZWEIG, R. **Presence of immunoglobulins on the surface of circulating trypomastigotes of *T. cruzi* resulting in activation of the alternative pathway of complement and lysis.** PAHO. Sci. Publ., 347:71, 1977.

KULKARNI, M.M.; CHERY, L.O.; ENGMAN, D.M.; McGWIRE B.S. ***Trypanosoma cruzi* GP63s undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection.** Infect. Immun., 77(5), 2193-2200, 2009.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227, 680-685, 1970.

LAFONT, F.; VERKADE, P.; GALLI, T.; WIMMER, C.; LOUVARD, D.; SIMONS, K. **Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96(7), 3734-3738, 1999.

LAMMICH, S.; KOJRO, E.; POSTINA, R.; GILBERT, S.; PFEIFFER, R.; JASIONOWSKI, M.; HAASS, C.; FAHRENHOLZ, F. **Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.** Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 3922-3927, 1999.

LEIRIÃO, P.; RODRIGUES, C.D.; ALBUQUERQUE, S.S.; MOTA, M.M. **Survival of protozoan intracellular parasites in host cells.** EMBO. Rep., 5(12), 1142-1147, 2004.

- LEMJABBAR, H.; BASBAUM, C. **Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells.** Nat. Med., 8:41-46, 2002.
- LEON, W.; VILLALTA, F.; QUEIROZ, T.; SZARFMAN, A. **Antibody-induced capping of the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*.** Infect. Immun., 26(3), 1218-1220, 1979.
- LIOTTA, L.A.; KLEINERMAN, J.; CATANZARO, P.; RYNBRANDT, D. **Degradation of basement membrane by murine tumor cells.** J. Natl. Cancer. Inst., 58, 1427-1431, 1977.
- LOUKAS, A.; JONES, M.K.; KING, L.T.; BRINDLEY, P.J. ; MCMANUS, D.P. **Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes.** Infect. Immun., 69, 3646-3651, 2001.
- LOWNDES, C.M., BONALDO, M.C., THOMAZ, N., GOLDENBERG, S. **Heterogeneity of metalloprotease expression in *Trypanosoma cruzi*.** Parasitol., 112, 393-399, 1996.
- LUFT, J.H. **The structure and properties of the cell surface coat.** Int. Rev. Cytol., 45, 291-382, 1976.
- MADISON, M.N.; KLESHCHENKO, Y.Y.; NDE, P.N.; SIMMONS, K.J.; LIMA, M.F.; VILLALTA F. **Human defensin alpha-1 causes *Trypanosoma cruzi* membrane pore formation and induces DNA fragmentation, which leads to trypanosome destruction.** Infect. Immun., 75(10), 4780-4791, 2007.
- MARTINS, C.L.; LOPES, A.; MARTINS, H.S.H.L.; BRANQUINHA, M.H.; VERMELHO, A.B. **Extracellular proteolytic activities in *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *dionisii*.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95 (II), 230, 2000.
- MATHIEU-DAUDÉ, F.; BOSSENO, M.F.; GARZON, E.; LELIÈVRE, J.; SERENO, D.; OUAISSI, A.; BRENIÈRE, S.F. **Sequence diversity and differential expression of Tc52 immuno-regulatory protein in *Trypanosoma cruzi*: potential implications in the biological variability of strains.** Parasitol. Res., 101(5), 1355-1363, 2007.
- McCONVILLE, M.J.; MULLIN, K.A.; ILGOUTZ, S.C.; TEASDALE, R.D. **Secretory pathway of trypanosomatid parasites.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66(1), 122-154, 2002.

McGWIRE, B.S.; O'CONNELL, W.A.; CHANG, K.P.; ENGMAN, D.M. **Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence.** J. Biol. Chem., 277(11), 8802-8809, 2002.

McKERROW, J.H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P.J.; BOUVIER, J. **The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa.** Annu. Rev. Microbiol., 47, 821-853, 1993.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R.E.; SCHWARZ, H.; RUSSEL, D.G. **The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage.** Mol. Biochem. Parasitol., 37, 263-273, 1989.

MEIRELLES, M.N.L.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S.G.; COSTA, E.M.; MURTA, A.C.M.; SCHARFSTEIN, J. **Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro.** Mol. Biochem. Parasitol., 52, 175-184, 1992.

MELO, R.C. & BRENER, Z. **Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains.** J. Parasitol., 64(3), 475-482, 1978.

MING, M.; CHUENKOVA, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M.E. **Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome.** Mol. Biochem. Parasitol., 59(2), 243-252, 1993.

MIRANDA-SANTOS, I.K.F.; CAMPOS-NETO, A. **Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the Trypanosomatidae.** J. Exp. Med., 154, 1732-1742, 1981.

MIRANDA-SANTOS, I.K.F. & CAMPOS-NETO, A. **Immune evasion by Trypanosomatidae: Normal aggregated immunoglobulin protects against lysis by the alternative complement pathway.** Braz. J. Med. Biol. Res., 28 (5), 585-589, 1995.

MONCAYO, A. **Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98(5), 577-591, 2003.

MONTERO, J.C. ; YUSTE, L. ; DÍAZ-RODRÍGUEZ E. ; ESPARÍS-OGANDO, A.; PANDIELLA, A. **Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent routes control shedding of transmembrane growth factors through multiple secretases.** Biochem. J., 363, 211-221, 2002.

MONTESEIRIN, J. ; CHACON, P. ; VEGA, A. ; SANCHEZ-MONTESEIRIN, H. ; ASTURIAS, J.A. ; MARTINEZ, A. ; GUARDIA, P. ; PEREZ-CANO, R. ; CONDE, J. **L-selectin expression on neutrophils from allergic patients.** Clin. Exp. Allergy.,35,1204-1213,2005.

MORGAN, B.P. & CAMPBELL, A.K. **The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium.** Biochem. J., 231, 205 -208, 1985.

MORGAN, B.P. ; DANKERT, J.R. & ESSER, A.F. **Recovery of human neutrophils from complement attack : removal of the membrane attack complex by endocytosis and exocytosis.** J. Immunol., 138, 246-253, 1987.

MORTARA, R.A. ; MINELLI, L.M. ; VANDEKERCKHOVE, F. ; NUSSENZWEIG, V. ; RAMALHO-PINTO, F.J. **Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) cleavage of GPI-anchored surface molecules of *Trypanosoma cruzi* triggers in vitro morphological reorganization of trypomastigotes.** J. Eukaryot. Microbiol., 48,27-37,2001.

MORTARA, R.A. ; ANDREOLI, W.K. ; TANIWAKI, N.N. ; FERNANDES, A.B. ; SILVA, C,V. ; FERNANDES, M.C. ; L'ABBATE, C. ; SILVA, S. **Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms.** An. Acad. Bras. Cienc. 77(1), 77-94, 2005.

MOSKOVICH, O. & FISHELSON, Z. **Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex.** J. Biol. Chem., 282(41), 29977-29986, 2007.

MUKHOPADHYAY, N.K.; SHOME, K. ; SAHA, A.K. ; HASSELL, J.R. ; GLEW, R.H. **Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation.** Biochem. J. 1,517-25, 1989.

MURTA, A.C.; PERSECHINI, P.M.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J.A.; SCHARFSTEIN, J. **Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase.** Mol. Biochem. Parasitol., 43(1), 27-38, 1990.

NICOLSON, G.L. **Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmatic influence over cell surface components.** Biochim. Biophys. Acta., 457,57-108,1976.

NÓBREGA, O.T.; SANTOS SILVA, M.A.; TEIXEIRA, A.R.; SANTANA, J.M. **Cloning and sequencing of *tccb*, a gene encoding a *Trypanosoma cruzi* cathepsin B-like protease.** Mol. Biochem. Parasitol., 97(1-2), 235-240, 1998.

NORTH, M.J.; COOMBS, G.H. & BARRY, J.D. **A comparative study of the proteolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. vivax*, *Leishmania tarentolae* and *Crithidia fasciculata*.** Mol. Biochem. Parasitol., 9(2),161-180, 1983.

OCHIENG, J.; PRATA, P. S.; KHATUA, A.K.; SAKWE, A.M. **Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes.** Exp. Cell. Res., 315(11), 1875-1888, 2009.

OLVER, C.; VIDAL, M. **Proteomic analysis of secreted exosomes.** Subcell. Biochem., 43, 99-131, 2007.

OSKOWOSKI, P.; TOTH, M.; FRIDMAN, R. **Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP).** J. Cell. Physiol., 200, 2-10, 2004.

OUAISSI, A.; AGUIRRE, T.; PLUMAS-MARTY, B.; PIRAS, M.; SCHÖNECK, R.; GRASMASSE, H.; TAIBI, A.; LOYENS, M.; TARTAR, A.; CAPRON, A.; PIRAS, R. **Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody.** Biol. Cell., 75(1), 11-17, 1992.



OURY, B.; TARRIEU, F.; MONTE-ALEGRE, A.; OUAISSI, A. ***Trypanosoma cruzi*: sequence polymorphism of the gene encoding the Tc52 immunoregulatory-released factor in relation to the phylogenetic diversity of the species.** Exp. Parasitol., 111(3), 198-206, 2005.

OVERATH, P. & ENGSTLER, M. **Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system.** Mol. Microbiol., 53, 735-744, 2004.

PAL, A.; HALL, B.S.; JEFFRIES, T.R.; FIELD, M.C. **Rab5 and Rab11 mediate transferrin and anti-variant surface glycoprotein antibody recycling in *Trypanosoma brucei*.** Biochem. J., 374, 443-451, 2003.

PARKIN, E.T.; TAN, F.; SKIDGEL, R.A.; TURNER, A.J.; HOOPER, N.M. **The ectodomain shedding of angiotensin-converting enzyme is independent of its localisation in lipid rafts.** J. Cell. Sci., 1, 3079-3087, 2003.

PATTERSON, M.K. JR. **Measurement of growth and viability of cells in culture.** Methods. Enzymol., 58, 141-152, 1979.

PEREIRA, M.E.; LOURES, M.A.; VILLALTA, F.; ANDRADE, A.F. **Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cell.** J. Exp. Med., 152: 1375-1392, 1980.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; ACOSTA-SERRANO, A.; CORREIA DE ALMEIDA, I.; FERGUSON, M.A.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M.M.; TRAVASSOS, L.R.; SCHENKMAN, S. **Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies.** J. Cell. Sci., 113 (7), 1299-1307, 2000.

PESCHON, J.J. ; SLACK, J.L.; REDDY, P. ; STOCKING, K.L.; SUNNARBORG, S.W. ; LEE, D.C. ; RUSSEL, W.E. ; CASTNER, B.J. ; JOHNSON, R.S. ; FITZNER, J.N. ; BOYCE, R.W. ; PINTO DA SILVA, P.; MARTINEZ-PALOMO, A. **Distribution of membrane**

**particles and gap junctions in normal and transformed 3T3 cells studied in situ, in suspension, and treated with concanavalin A.** Proc. Natl. Acad. Sci.,72,572-576, 1975.

PILZER, D.; GASSER, O.; MOSKOVICH, O.; SCHIFFERLI J.A.; FISHELSON, Z. **Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer.** Springer Semin. Immun., 27, 375-387, 2005.

PINHO, R.T.; VANNIER-SANTOS, M.A.; ALVES, C.R.; MARINO, A.P.; CASTELLO BRANCO, L.R.; LANNES-VIEIRA, J. **Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components.** Acta. Trop., 83(2), 103-115, 2002.

PINTO DA SILVA, P.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; GONZALEZ-ROBLES, A. **Membrane structure and surface coat of *Entamoeba histolytica*. Topochemistry and dynamics of the cell surface: cap formation and microexudate.** J. Cell. Biol., 64(3), 538-550, 1975.

POTOLICCHIO, I.; CARVEN, G.J.; XU, X.; STIPP, C.; RIESE, R.J.; STERN, L.J.; SANTAMBROGIO, L. **Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism.** J. Immunol., 175(4), 2237-2243, 2005.

RAEDER, R.; BOYLE, M.D. **Association between expression of immunoglobulin G-binding proteins by group A streptococci and virulence in a mouse skin infection model.** Infect. Immun.,61,1378-84,1993.

RATAJCZAK, J.; WYSOCZYNSKI, M.; HAYEK, F.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.. **Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication.** Leukemia., 20(9), 1487-1495, 2006.

RIBEIRO DOS SANTOS, R. ; HUDSON, L. ***Trypanosoma cruzi* : binding of parasite antigens to mammalian cell membranes.** Parasite Immunol., 2, 1-10, 1980.

RISSO, M.G. ; GARBARINO, G.B. ; MOCETTI, E. ; CAMPETELLA, O. ; GONZALEZ CAPPA, S.M. ; BUSCAGLIA, C.A. ; LEGUIZAMON, M.S. **Differential expression of a**

virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. J. Infect. Dis., 189(12), 2250-2259, 2004.

RUIZ, R.C. ; FAVORETO, S. JR. ; DORTA, M.L. ; OSHIRO, M.E. ; FERREIRA, A.T. ; MANQUE, P.M. ; YOSHIDA, N. **Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity.** Biochem. J., 330 (1), 505-511, 1998.

SANGENITO, L.S. ; ENNES-VIDAL, V. ; MARINHO, F.A. ; DA MOTA, F.F. ; SANTOS, A.L.S. ; D'AVILA-LEVY, C.M. ; BRANQUINHA, M.H. **Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms.** Parasitol., 136, 433-441, 2009.

SANTANA, J.M., GRELLIER, P., SCHRÉVEL, J., TEXEIRA, A.R.L. **A *Trypanosoma cruzi* secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV.** Biochem. J., 324, 129-137, 1997.

SANTOS, A.L.S., FERREIRA, A., FRANCO, V.A., ALVIANO, C.S., SOARES, R.M.A. **Characterization of proteinases in *Herpetomonas anguteri* and *Herpetomonas roitmani*.** Cur. Microbiol., 39, 61-64, 1999.

SANTOS, A.L. ; BRANQUINHA, M.H. ; D'AVILA-LEVY, C.M. **The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function.** An. Acad. Bras. Cienc., 78(4), 687-714, 2006.

SARAIVA, E.M. ; VANNIER-SANTOS, M.A. ; SILVA-FILHO, F.C. ; DE SOUZA, W. **Anionic site behaviour in *Leishmania* and its role in the parasite-macrophage interaction.** J. Cell. Sci., 93, 481-489, 1989.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.; LIMA, A.P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MÜLLER-ESTERL, W. **Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors.** J. Exp. Med., 192(9), 1289-1300, 2000.

SCHENKMAN, S.; YOSHIDA, N.; CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. **Glycophosphatidylinositol-anchored proteins in metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi***. Mol. Biochem. Parasitol., 29, 141-151, 1988.

SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R. & METCALF, P. **The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63)**. Structure., 6(8), 1035-1046, 1998.

SCHLÖNDORFF, J.; BLOBEL, C.P. **Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding**. J. Cell. Sci., 112, 3608-3617, 1999.

SCHMUÑIS, G.A.; SZARFMAN, A.; LANGEMBACH, T.; DE SOUZA, W. **Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* antibodies**. Infect. Immun., 20, 567-569, 1978.

SCHMUÑIS, G.A.; SZARFMAN, A.; DE SOUZA, W.; LANGEMBACH, T. ***Trypanosoma cruzi*: antibody-induced mobility of surface antigens**. Exp. Parasitol., 50, 90-102, 1980.

SEYFANG, A.; MECKE, D.; DUSZENKO, M. **Degradation, recycling, and shedding of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein**. J. Protozool., 37(6), 546-552, 1990.

SHUKLA, S. D.; BERRIMAN, J.; COLEMAN, R.; FINEAN, J.B.; MICHELL, R.H. **Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes**. FEBS Lett., 90, 289-292, 1978.

SILVA, L.H.P. & NUSSSENSWEIG, V. **Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco**. Fol. Clin. Biol., 20, 191-207, 1953.

SIMONS, K. & IKONEN, E. **Functional rafts in cell membranes**. Nature., 387(6633), 569-572, 1997.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T. & DE SOUZA, W. **Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi***. J. Cell. Sci., 102 (1), 157-67, 1992.

- SOEIRO, M.D.E. N.; PAIVA, M.M.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.D.E. N.; ARAÚJO-JORGE, T.C. **A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after infection.** Cell. Struct. Funct., 24(3), 139-149, 1999.
- SOUTO-PADRÓN, T.; CARVALHO, T.U. & DE SOUZA, W. **Further studies on the cell surface charge of *Trypanosoma cruzi*.** Acta. Trop., 41, 215-225, 1984.
- SOUTO-PADRÓN, T. & DE SOUZA, W. **The surface charge of *Trypanosoma cruzi*: analysis using cell electrophoresis, lectin and ultrastructural cytochemistry.** J. Submicroscop. Cytol., 18, 701-709, 1986.
- SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O.E.; CAZZULO, J.J.; DE SOUZA, W. **Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction.** J. Cell. Sci., 96, 485-490, 1990.
- STOCKDALE, C.; SWIDERSKI, M.R.; BARRY, J.D.; MCCULLOCH, R. **Antigenic Variation in *Trypanosoma brucei*: Joining the DOTs.** PLOS Biol., 6(7), 1386-1391, 2008
- SZARFMAN, A. ; QUEIROZ, T. ; DE SOUZA, W. **Mobility of concanavalin A receptors in *Trypanosoma cruzi*.** J. Parasitol., 66,1055-1057,1980.
- TAKAHASHI, K.; IP, W.E.; MICHELOW, I.C.; EZEKOWITZ, R.A. **The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule.** Curr. Opin. Immunol.,18(1),16-23, 2006.
- TARABOLETTI ET, G.; D'ASCENZO, S.; BORSOTTI, P.; GIAVAZZI, R.; PAVAN, A.; DOLO, V. **Shedding of the matrix metalloproteinase MMP-2, MMP-9 and MT1-MMP as membrane vesicle- associated components by endothelial cells.** Amer. J. Path., 160, 673-680, 2002.
- TOMAS, A.M. & KELLY, J.M. **Stage-regulated expression of cruzipain the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA.** Mol. Biochem. Parasitol., 76, 91-103, 1996.

TOMAS, A.M.; MILES, M.A. & KELLY, J.M. **Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis.** Eur. J. Biochem., 244, 596-603, 1997.

TORRECILHAS, A.C.T.; TONELLI, R.R.; PAVANELLI, W.R.; DA SILVA, J.S.; SCHUMACHER, R.I.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N.; DE ALMEIDA A. I.; COLLI, W.; ALVES, M.J. M. ***Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response.** Microbes. Infect., 11(1), 29-39, 2009.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi*.** Int. J. Parasitol., 31, 472-481, 2000.

VALDIVIESO, E., DAGGER, F. & RASCÓN, A. ***Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity.** Exp. Parasitol., 116(1), 77-82, 2007.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; DE VEER, G.; KROL, J.H.; EMMELO, T. P. **Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRS1 cells.** Biochim. Biophys. Acta, 688, 495-504, 1982.

VAN VOORHIS, W.C.; SCHLEKEWY, L.; TRONG, H.L. **Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the Fl-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide.** Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 5993-5997, 1991.

VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; EL BOUHDIDI, A.; VAN BEECK, K.; CARLIER, Y.; DUBREMETZ, J.F.; VERSCHUEREN, H. **Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture.** Parasite Immunol., 21, 555-563, 1999.

VICKERMAN, K. **The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 56, 487-495, 1962.

VICKERMAN, K. **The fine structure of *Trypanosoma congolense* in its bloodstream phase.** J. Protozool., 16(1), 54-69,1969.

VINCENDEAU, P.; DAERON, M. ***Trypanosoma musculli* co-express several receptors binding rodent IgM, IgE and IgG subclasses.** J. Immunol., 142,1702,1709,1989.

VITTETA, E.S.; UHR, J.W. **Release of cell surface immunoglobulin by mouse splenic lymphocytes.** J. Immunol., 108, 577-579,1972.

WERB, Z.; YAN, Y. **A cellular striptease act.** Science 13, 1279-1280, 1998.

WESTON, D.; PATEL, B. & VAN VOORHIS, W.C. **Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes.** Mol. Biochem. Parasitol., 98(1), 105-116, 1999.

WHITE, A.C. JR.; ROBINSON, P.; KUHN, R. ***Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response.** Chem. Immunol., 66, 209-230, 1997.

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

WIEDMER, T.; SHATTIL, S.J.; CUNNINGHAM, M.; SIMS, P.J. **Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plamas membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor.** Biochem. 29 (3), 623-632, 1990.

YAO, C.; DONELSON, J.E. & WILSON, M.E. **The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression and function.** Mol. Biochem. Parasitol., 132, 1-16, 2003.

ZINGALES, B. & COLLI, W. ***Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., 117, 129-152,1985.

# 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](#)