



**ESTUDOS DE FATORES BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS  
ENVOLVIDOS NA TRANSMISSÃO DE  
TRIPANOSOMATÍDEOS PATOGENICOS POR SEUS  
VETORES**

Luciana Teixeira Zimmermann

Tese de Doutorado apresentada 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 à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Angela Hampshire de C. S. Lopes

RIO DE JANEIRO  
JULHO DE 2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ESTUDOS DE FATORES BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS  
NA TRANSMISSÃO DE TRIPANOSOMATÍDEOS PATOGÊNICOS POR  
SEUS VETORES

Luciana Teixeira Zimmermann

Orientadora: Angela Hampshire de C. S. Lopes

Tese de Doutorado apresentada 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 à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Aprovada por:

---

(José Roberto Meyer Fernandes, IBqM - UFRJ)

---

(Angela Hampshire de C. S. Lopes, IMPPG - UFRJ)

---

(Marcelo Salabert Gonzalez, UFF)

---

(Geórgia Correa Atella, IBqM - UFRJ)

---

(Marta Helena Branquinha, IMPPG - UFRJ)

RIO DE JANEIRO  
JULHO DE 2010

Zimmermann, Luciana Teixeira

Estudos de fatores biológicos e bioquímicos envolvidos na transmissão de tripanosomatídeos patogênicos por seus vetores / Luciana Teixeira Zimmermann – Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG, 2010 Xiv, 88f.

Orientadora: Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes

Tese [Doutorado em Ciências (Microbiologia)]

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia

Prof. Paulo de Góes, 2010.

Referências bibliográficas:f 79-88.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. *Leishmania chagasi* 3. Interação 4. Fator de ativação de plaquetas 5. *Rhodnius prolixus* 6. Temperatura

I. Lopes, Angela H.C.S.

II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia).

III. Estudos de fatores biológicos e bioquímicos envolvidos na transmissão de tripanosomatídeos patogênicos por seus vetores.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Angela Hampshire de Carvalho dos Santos Lopes e com apoio financeiro das seguintes instituições: CNPq, CAPES, FAPERJ e FINEP.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Angela, que além de ser uma ótima orientadora, consegue ser uma “mãezona” e ainda arruma um tempinho para me ouvir chorar sempre que eu preciso!

Aos meus pais e meus irmãos, por todo apoio e amor que sempre tive e por sempre acreditarem em mim.

Ao Chris, por me ajudar (e me atrapalhar!) sempre que precisei, por todo amor e carinho (e paciência!).

Aos amigos de laboratório: Marta, Danielle, Cirilo, Paulo, Fernando, pela amizade, boa companhia e ajuda.

À prof<sup>a</sup> Elvira Saraiva, pela sua dedicação e paciência, pela ajuda e ensinamentos, e aos seus alunos, pela ajuda e por sempre me receberem bem em seu laboratório.

À prof<sup>a</sup>. Adriane Todeschini, e ao seu aluno Sebastião, pelas idéias e ajuda com as trans-sialidases.

Ao prof. Fernando Costa e Silva, pela ajuda nos experimentos com carga de superfície.

Ao prof. Marcelo Gonzalez, por toda ajuda e amizade enquanto estávamos na Alemanha.

À prof<sup>a</sup>. Rossiane Vommaro, pelas ótimas sugestões e idéias no início do meu doutorado.

Ao prof. Walter Oelemann e à prof<sup>a</sup>. Eliana Bergter, pelo incentivo e ajuda com a bolsa de doutorado sanduíche.

Ao prof. Günter Schaub (Ruhr Universität Bochum), por me aceitar em seu laboratório, pelos ensinamentos (em alemão!) e pela paciência. Aos seus alunos e funcionários: Jenny, Carsten, Christian, Agnes, Ruth e Charles, pela ajuda e amizade.

À prof<sup>a</sup>. Marta Branquinha, minha revisora, pela paciência e dedicação ao corrigir esta tese.

Ao Júnior e à Litiane, pela companhia agradável e por me ajudarem sempre. Muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX-0885), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

À todos que ajudaram na realização deste trabalho.

*Dedico esta tese a todas as pessoas  
que eu amo, pelo incentivo, força,  
apoio, amizade e amor incondicional.  
Sem eles nada disso seria possível.*



## RESUMO

ESTUDOS DE FATORES BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS ENVOLVIDOS  
NA TRANSMISSÃO DE TRIPANOSOMATÍDEOS PATOGÊNICOS POR  
SEUS VETORES

Luciana Teixeira Zimmermann

Orientadora: Angela Hampshire de C. S. Lopes

Resumo da Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências (Microbiologia).

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas no mundo e a Organização Mundial da Saúde aponta, como uma das principais causas do insucesso global no combate a essas doenças, o desconhecimento da biologia dos vetores e parasitos, sendo que uma das principais estratégias de controle é o combate aos vetores. Tendo em vista que a taxa de desenvolvimento de populações de insetos depende diretamente de características relacionadas ao crescimento dos estágios imaturos, onde o principal fator regulador é a temperatura, decidimos analisar a postura de ovos de fêmeas de *Rhodnius prolixus*, uma das espécies vetoras da doença de Chagas, em diferentes temperaturas. Nós constatamos que fêmeas de *R. prolixus* são capazes de por ovos entre as temperaturas de 18 e 38°C, sendo que a postura é maior entre as temperaturas de 22 e 34°C. A maior taxa de eclosão foi encontrada entre os ovos que foram postos entre as temperaturas de 22 e 30°C, sendo que as temperaturas ótimas para eclosão ficaram entre 24 e 34°C. Em experimentos preliminares demonstramos que a presença do conteúdo do intestino de *Triatoma infestans* foi capaz de inibir o crescimento de bactérias presentes em seu estômago.

Esta inibição está relacionada à atividade da catepsina D, uma vez que esse efeito foi abolido pela presença de seu inibidor, a pepstatina. Acompanhando a infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*, vimos que as principais formas evolutivas encontradas no intestino dos insetos foram as formas epimastigotas e os intermediários entre epimastigotas e tripomastigotas. Já no reto, as principais formas foram as tripomastigotas.

O fator de ativação de plaquetas (PAF) é um fosfolipídio que possui diversos efeitos fisiológicos e patofisiológicos, incluindo diferenciação celular, inflamação e alergia. Trabalhos de nosso laboratório mostraram que o PAF induz o processo de diferenciação celular de epimastigota para tripomastigota em *T. cruzi* e é capaz de modular a interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos peritoneais de camundongos “in vitro”. Observamos nesse trabalho que, tanto quando os insetos *R. prolixus* são alimentados artificialmente, quanto em experimentos “ex vivo” utilizando-se intestino extraído dos insetos, havia um grande aumento no número de células de *T. cruzi* quando as formas epimastigotas são previamente tratadas com PAF 10 µM. Vimos também que nos epimastigotas tratados com PAF a carga de superfície se encontra mais negativa, e apresentam maior quantidade de ácido siálico.

Nós vimos também o efeito do PAF, assim como de diferentes moduladores de sinalização celular, na interação de *Leishmania chagasi* com uma linhagem celular de *Lutzomyia longipalpis* “in vitro”. Quando os parasitos foram pré-tratados com PAF 10 µM houve um aumento de 100% no índice de associação, em comparação ao sistema controle. Neste processo, sugerimos o envolvimento de vias de sinalização celular com participação de proteína cinase C e proteína cinase CK2, uma vez que seus inibidores foram capazes de modular a interação de *L. chagasi* com as células de linhagem contínua, LL-5, provenientes de *Lu. longipalpis*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius prolixus*, Temperatura, Interação, Fator de ativação de plaquetas, *Leishmania chagasi*

## ABSTRACT

STUDY OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FACTORS INVOLVED IN  
THE TRANSMISSION OF PATHOGENIC TRYPANOSOMATIDS BY THEIR  
VECTORS

Luciana Teixeira Zimmermann

Orientadora: Angela Hampshire de C. S. Lopes

*Abstract* da Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências (Microbiologia).

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is one of the 13 most neglected tropical diseases worldwide, and according to the World Health Organization, the major cause of failure in the global fight against these diseases is the lack of knowledge about the biology of vectors and parasites, and one of the main control strategies is to combat the vectors. Given that the rate of development of insect populations is directly dependent on characteristics related to the growth of immature stages, in which the main regulating factor is the temperature, we decided to examine the egg-laying of *Rhodnius prolixus* females, one of the vector species of Chagas disease, at different temperatures. We found that *R. prolixus* females are able to lay eggs between temperatures of 18 and 38°C, and the posture was greatest between 22 and 34°C. The highest hatching rate was found among the eggs that were placed between the temperatures of 22 and 30°C, while the optimal temperatures for hatching were between 24 to 34°C. In preliminary experiments we demonstrated that the presence of gut contents of *Triatoma infestans* was able to inhibit the growth of bacteria from its stomach. This inhibition is related to cathepsin D activity, since this effect was abolished by the presence of its inhibitor, pepstatin. Following the infection of *T. infestans* by *T. cruzi*, we saw

that the major evolutive forms found in the intestine of insects were epimastigotes and the intermediate forms between epimastigotes and trypomastigotes. In the rectum, the major forms were trypomastigotes.

The platelet activating factor (PAF) is a phospholipid that has many physiological and pathophysiological effects including cell differentiation, allergy and inflammation. Our laboratory showed that PAF induces *T. cruzi* cellular differentiation process from epimastigote to trypomastigote and is capable of modulating the interaction of *Leishmania amazonensis* with mouse peritoneal macrophages “in vitro”. In this work, we found that when *R. prolixus* insects are fed artificially, as well as in “ex vivo” experiments using intestines extracted from insects, there was a large increase in the number of *T. cruzi* epimastigotes found when they are previously treated with 10  $\mu$ M PAF. We have also seen that in PAF-treated epimastigotes the surface charge is more negative, presenting a higher amount of sialic acid.

We have also seen the effect of PAF, as well as various cell signaling modulators, on the interaction of *Leishmania chagasi* with a cell line from *Lutzomyia longipalpis* “in vitro”. When the parasites were pre-treated with 10  $\mu$ M PAF there was a 100% increase in the association index as compared with control systems. In this process, we suggest the involvement of cell signaling pathways with the involvement of protein kinase C and protein kinase CK2, since their inhibitors were able to modulate the interaction of *L. chagasi* with the continuous cell line LL-5, from *Lu. longipalpis*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius prolixus*, Temperature, Interaction, Platelet-activating factor, *Leishmania chagasi*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
I. INTRODUÇÃO	
1. Os tripanosomatídeos.....	1
1.1. Gênero <i>Trypanosoma</i> .....	3
1.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.....	3
1.2. Gênero <i>Leishmania</i> e as leishmanioses.....	8
1.2.1. <i>Leishmania chagasi</i> .....	12
2. Insetos vetores.....	13
2.1. Os Triatomíneos.....	13
2.1.1. <i>Rhodnius prolixus</i> .....	16
2.1.2. <i>Tritatoma infestans</i> .....	16
2.2 Os flebotomíneos.....	16
2.2.1. <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	17
3. Interação parasito-hospedeiro.....	18
4. Sinalização celular.....	20
5. Proteínas cinases.....	23
6. Fator de ativação de plaquetas.....	24
II. PROPOSIÇÃO.....	
28	
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	
29	
1. Reagentes.....	29
2. Parasitos.....	29
3. Insetos.....	30
4. Cultura de células de flebotomíneos.....	30
5. Acompanhamento da postura e eclosão dos ovos de fêmeas de <i>Rhodnius prolixus</i> em diferentes temperaturas.....	30
6. Ação da atividade enzimática intestinal sobre a população de simbiontes em <i>Triatoma infestans</i> .....	31

7. Infecção de <i>Triatoma infestans</i> por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	31
8. Tratamento de <i>Trypanosoma cruzi</i> com PAF e WEB2086.....	32
9. Tratamento de <i>Trypanosoma cruzi</i> com neuraminidase.....	32
10. Interação de <i>Trypanosoma cruzi</i> com intestino de <i>Rhodnius prolixus</i> .....	32
11. Infecção de <i>Rhodnius prolixus</i> por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	33
12. Medida do potencial zeta.....	33
13. Medida do ácido siálico.....	33
14. Interação de <i>Leishmania chagasi</i> com células de <i>Lutzomyia longipalpis</i> ....	33
15. Análise estatística.....	34
IV. RESULTADOS.....	34
1. Oviposição e mortalidade de fêmeas de <i>Rhodnius prolixus</i> em diferentes temperaturas.....	34
2. Eclosão dos ovos de <i>Rhodnius prolixus</i> em diferentes temperaturas.....	41
3. Ação da atividade enzimática do intestino sobre a população de simbiosites de <i>Triatoma infestans</i> .....	44
4. Interação de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Chile 5) com <i>Triatoma infestans</i> .....	45
5. Efeito do PAF na interação de <i>Trypanosoma cruzi</i> (clone Dm 28c) com <i>Rhodnius prolixus</i> .....	53
6. Efeito do PAF na carga de superfície de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	55
7. Ação da neuraminidase na interação de <i>Trypanosoma cruzi</i> com <i>Rhodnius prolixus</i> .....	56
8. Modulação da quantidade de ácido siálico de <i>Trypanosoma cruzi</i> pelo PAF.....	57
9. Efeito do PAF e de diferentes moduladores de sinalização intracelular na interação de <i>Leishmania chagasi</i> com cultura de células de <i>Lutzomyia longipalpis</i> “in vitro” .....	58
V. DISCUSSÃO.....	65
VI. CONCLUSÕES.....	77
VII. REFERENCIAS.....	79
VIII. ANEXOS.....	88

## LISTA DE ABREVIACOES

AMPC: Adenosina monofosfato cíclica

ATP: Adenosina tri-fosfato

BIS: Bisindolilmaleimida

CK2: Caseína cinase 2

DAG: Diacilglicerol

IP3: Inositol tri-fosfato

MAPK: "Mitogen-Activated Protein" cinase

MAPKK: "Mitogen-Activated Protein" cinase cinase

PAF: Fator de ativação de plaquetas, 1-*o*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

PIP<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol bi-fosfato

PKC: Proteína cinase C

PLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A2

PLC: Fosfolipase C

TBB: 4, 5, 6, 7, tetrabromobenzotriazol

WEB 2086: 3-[4-(2-clorofenil)-9-metil-6H-tieno-[3,2-f][1,2,4]triazolo-[4,3, $\alpha$ -][1,4]diazepina-2- $\gamma$ 1-1-(4-morfolina- $\gamma$ 1)-1-propanona

## I. INTRODUÇÃO

### 1. Os tripanossomatídeos

A família Trypanosomatidae apresenta grande importância na área médica, já que possui espécies potencialmente patogênicas para o homem (VICKERMAN, 1985). Os tripanossomatídeos são organismos unicelulares eucarióticos, possuindo corpo celular, núcleo e organelas citoplasmáticas delimitadas por uma bicamada lipídica, dentre as quais se destaca uma mitocôndria única, ramificada por todo o corpo celular, cujo DNA possui um arranjo único na natureza e forma uma estrutura típica, denominada cinetoplasto, que fica localizado próximo aos cinetossomos do flagelo. O DNA mitocondrial (k-DNA) representa cerca de 30% do DNA total desses parasitos (MCGHEE & COSGROVE, 1980; MASLOV & SIMPSON, 1995).

Nos tripanossomatídeos, o flagelo único emerge da bolsa flagelar, localizada na região anterior do corpo celular, e encontra-se ancorado à célula pelos corpos basais, os quais estão fisicamente associados à mitocôndria (VICKERMAN & TETLEY, 1990; WEBSTER & RUSSELL, 1993).

No glicossoma, estrutura exclusiva da ordem Kinetoplastida, ocorre a compartimentalização da via glicolítica, o que tornou o mecanismo de conversão de glicose em piruvato mais eficiente nos tripanossomatídeos do que na maioria dos outros organismos eucarióticos. Esta organela coopera com a mitocôndria no metabolismo energético (VICKERMAN, 1994). Já o acidocalcissoma possui no seu interior uma alta concentração de fósforo, cálcio, magnésio, sódio e zinco, além de uma variedade de bombas e proteínas trocadoras presentes em sua membrana, o que ressalta a sua importância na regulação do pH intracelular e na osmorregulação, no armazenamento intracelular de energia e cálcio para inúmeros processos bioquímicos essenciais (DOCAMPO & MORENO, 1999).

Os tripanossomatídeos possuem um citoesqueleto formado por uma camada de microtúbulos subpeliculares que se apresentam em associação à membrana plasmática, dando forma e sustentação à célula (BRENER & ANDRADE, 1979). O citoesqueleto atua, também, como barreira contra a



exocitose e endocitose, que ocorrem somente na região da bolsa flagelar, região desprovida de microtúbulos subpeliculares (DE SOUZA, 1984).

Os membros desta família são divididos em nove gêneros: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Rhynchoidomonas* e *Trypanosoma*. Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* possuem grande importância médica e veterinária, por apresentar espécies causadoras de doenças no homem e em animais. O gênero *Phytomonas* apresenta parasitos heteroxênicos de invertebrados e plantas, também de grande importância econômica (VICKERMAN, 1994). Além desses, outros três gêneros foram propostos: *Wallaceina* (PODLIPAEV, FROULOU & KOLESNIKOV 1990), *Angiomonas* (SOUSA & CORTE-REAL, 1991) e *Strigomonas* (BRANDÃO *et al.*, 2000).

Os gêneros da família Trypanosomatidae podem ser divididos em dois grupos, dependendo do ciclo evolutivo que apresentam. Os gêneros monoxênicos são aqueles onde os parasitos desenvolvem-se em apenas um hospedeiro, e nos gêneros heteroxênicos os parasitos necessitam de dois hospedeiros durante seu ciclo de vida (VICKERMAN, 1994).

Estes flagelados podem apresentar diferentes formas evolutivas, caracterizadas pela morfologia do corpo celular, presença ou ausência de flagelo externo, local de emergência do flagelo e posição do complexo cinetoplasto-bolsa flagelar-flagelo em relação ao núcleo (HOARE & WALLACE, 1966). Alguns tripanossomatídeos sofrem um processo de diferenciação celular, em resposta a mudanças ambientais. Este processo leva a mudanças na forma e na fisiologia destes parasitos durante o seu ciclo de vida. Essas transformações são de fundamental importância no ciclo de vida desses flagelados, uma vez que alguns possuem ciclos que envolvem um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado ou uma planta. Assim, faz-se necessária a adaptação do parasito a ambos os ambientes e isso envolve extensivas alterações morfofisiológicas (BOWEN & FLYNN, 1976; MANNING-CELA, JAISHANKAR & SWINDLEB, 2006).

## 1.1. O gênero *Trypanosoma*

Neste gênero são encontrados protozoários capazes de parasitar todas as classes de vertebrados: peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. A grande maioria das espécies não é patogênica para o homem. Quando ocorre a infecção não necessariamente haverá geração da doença, para tal são necessários vários fatores, como susceptibilidade do hospedeiro e a patogenicidade do parasito (MARQUARDT & DEMARRE, 1985).

De acordo com seu desenvolvimento no inseto vetor, os membros do gênero *Trypanosoma* foram divididos em dois grupos ou seções. Quando uma espécie se desenvolve na porção anterior do trato digestivo do inseto, o parasito é classificado dentro da seção Salivaria, na qual a transmissão ocorre por inoculação de formas infectivas durante o repasto sanguíneo. Quando o desenvolvimento ocorre na região posterior do trato digestivo do inseto, o parasito é classificado dentro da seção Stercoraria, na qual a transmissão ocorre por contaminação fecal; o vetor elimina as fezes, contendo formas infectivas, no local da picada, durante o repasto sanguíneo (HOARE, 1966).

Dois tipos de tripanossomíases humanas são conhecidos: a tripanossomíase americana e a africana. A tripanossomíase africana, ou doença do sono, é causada pelo *Trypanosoma brucei*, que é transmitido por moscas hematófagas, conhecidas como tsé-tsé, que inoculam as formas infectantes do parasito durante o repasto sanguíneo. A tripanossomíase americana, ou doença de Chagas, é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido por insetos hematófagos da subfamília Triatominae (SIQUEIRA, 2000).

### 1.1.1. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Esta doença apresenta uma fase aguda, que pode levar à morte, especialmente em crianças pequenas. A forma crônica da doença afeta vários órgãos do corpo, freqüentemente causando dano fatal ao coração e sistema digestivo. A transmissão ocorre através de insetos triatomíneos hematófagos (principalmente dos gêneros *Triatoma* e *Rhodnius*), por transfusão sanguínea

ou via placenta. Cerca de um terço das infecções agudas evoluem para as formas crônicas, que se desenvolvem 10-20 anos mais tarde. Quando a fase crônica começa, normalmente já é muito tarde para o tratamento: os sintomas de comprometimento cardíaco ou as sérias disfunções do esôfago e cólon podem ser irreversíveis. Os pacientes ficam cada vez mais doentes e podem sofrer morte súbita por insuficiência cardíaca (RASSI, RASSI & MARIN-NETO, 2010).

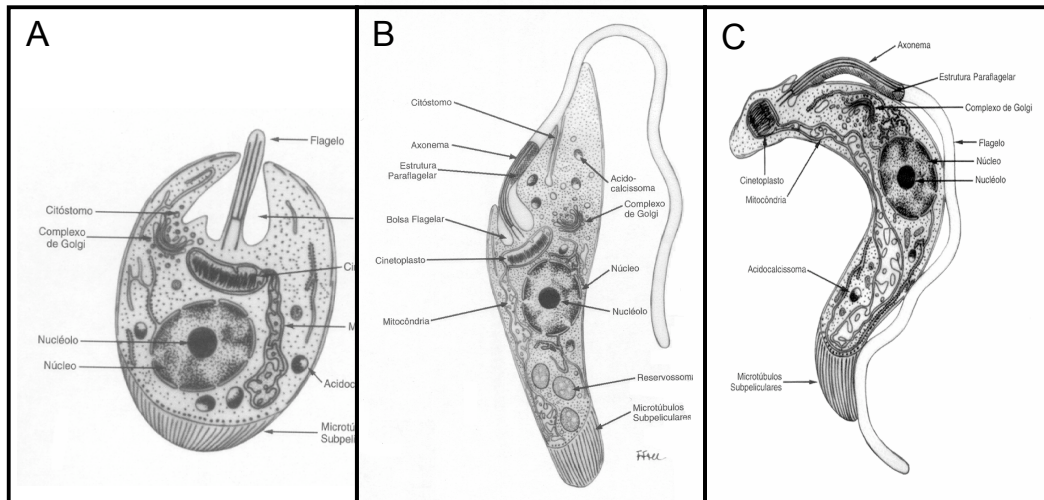
Carlos Chagas, em 1909, reconheceu não só a doença, como também seu agente etiológico e o inseto vetor. Desde então, a doença de Chagas tem se mostrado amplamente distribuída na América Central e do Sul, com altos índices de morbidade e mortalidade (DIAS *et al.*, 2002). Estima-se que mais de 14 milhões de pessoas estejam infectadas na América Latina, e cerca de 100 milhões vivem em área de risco (TELLERIA *et al.*, 2006).

O agente etiológico da doença, o *T. cruzi*, é um parasita heteroxênico, possuindo dois hospedeiros distintos durante seu ciclo, um vertebrado e outro invertebrado. Está agrupado na seção Stercoraria, pois se desenvolve na porção posterior do trato digestivo do hospedeiro invertebrado. Dependendo da fase do ciclo, o *T. cruzi* pode apresentar as seguintes formas evolutivas (Fig. 1): amastigota e tripomastigota sanguíneo, no hospedeiro vertebrado, além de epimastigota e tripomastigota metacíclico, no hospedeiro invertebrado.

A) Forma amastigota: caracterizada por apresentar pequenas dimensões, corpo arredondado, praticamente imóvel, localizada no interior da célula hospedeira, possui um núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico e um flagelo curto, visível apenas por microscopia eletrônica.

B) Forma epimastigota: apresenta cinetoplasto com localização antero-lateral ao núcleo e o flagelo emerge lateralmente ao corpo celular.

C) Forma tripomastigota: pode ser forma tripomastigota sanguínea (hospedeiro vertebrado) ou metacíclicas (hospedeiro invertebrado). Possui cinetoplasto localizado na região posterior ao núcleo, por onde emerge o flagelo, que se encontra ligado ao corpo celular, por quase todo o corpo do parasito. Com movimento do flagelo, esta membrana é puxada, dando a impressão de uma “membrana ondulante”.

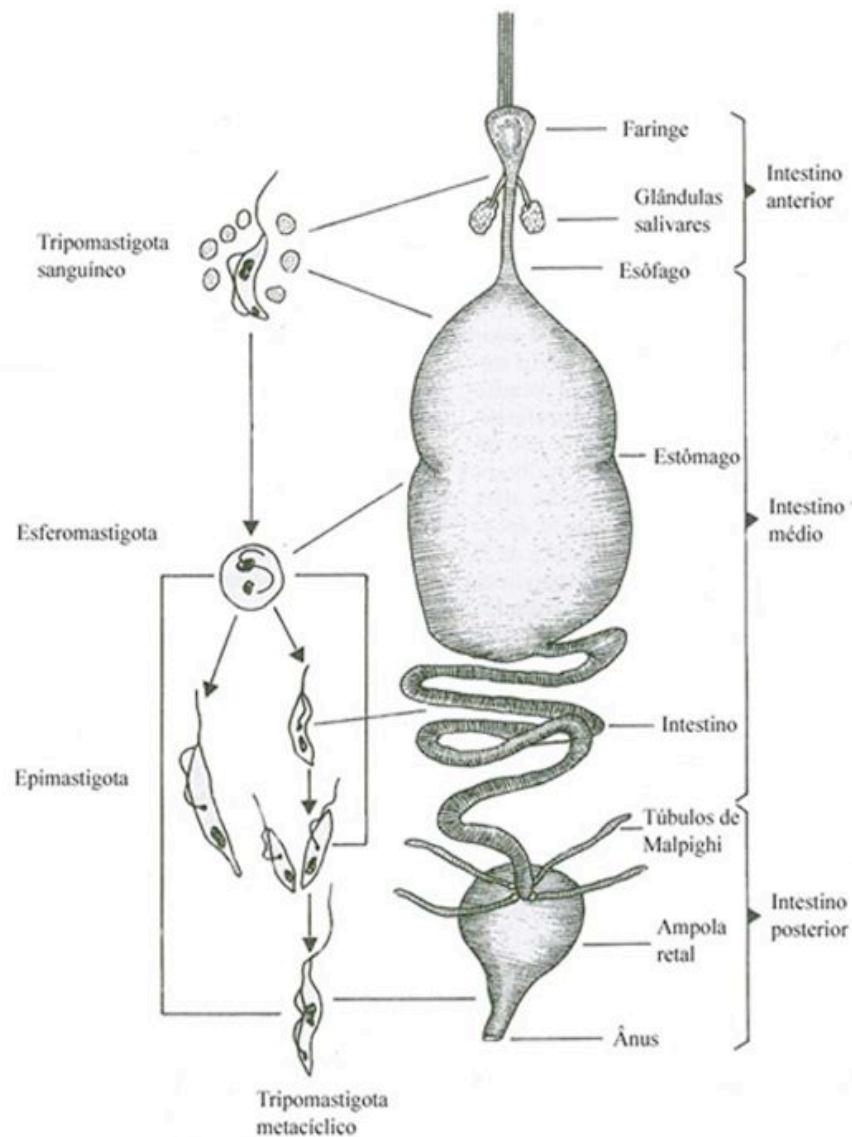


**Figura 1:** Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. **A:** amastigota, **B:** epimastigota, **C:** tripomastigota. (DE SOUZA, 2002).

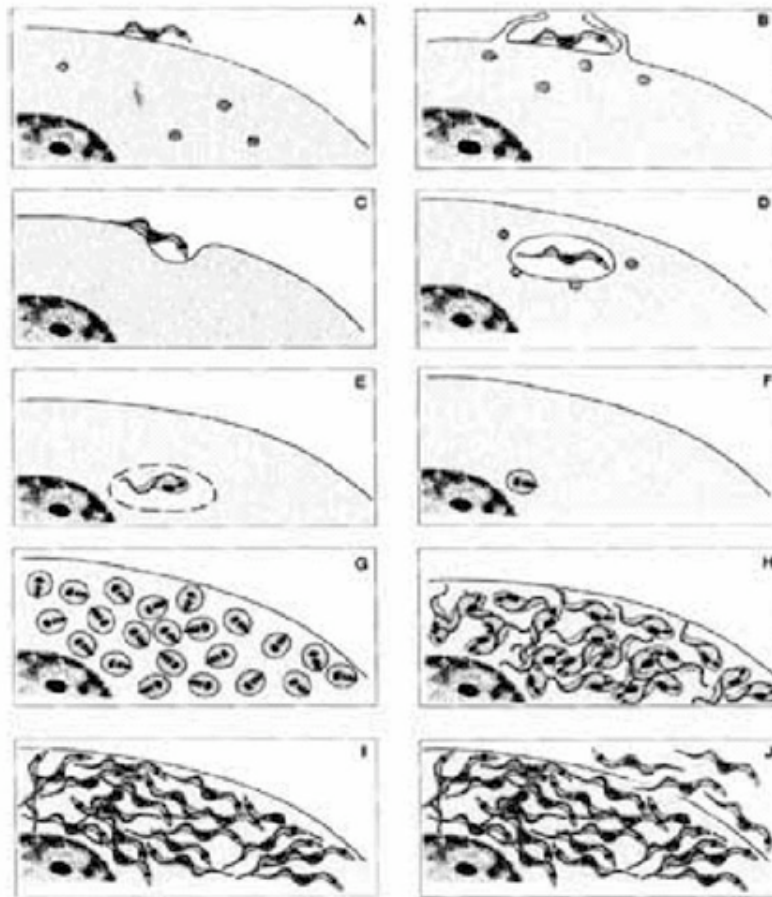
Em seu ciclo biológico (Fig. 2), os triatomíneos picam o hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo junto com sangue formas tripomastigotas do parasito. Na porção inicial do aparelho digestivo do inseto, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas. No intestino médio posterior, as formas epimastigotas se multiplicam. No intestino posterior ocorre a diferenciação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos. Os epimastigotas se aderem através do flagelo ao epitélio retal por hemidesmossomas, antes que aconteça a metaciclologênese. Os tripomastigotas metacíclicos se acumulam no intestino posterior e são eliminados nas fezes e urina, juntamente com epimastigotas não diferenciados (DE SOUZA, 2002).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto defeca e, juntamente com as fezes, elimina as formas tripomastigotas metacíclicas do parasito na pele do hospedeiro vertebrado. Através de lesões já existentes ou provocadas pela picada do inseto, o *T. cruzi* entra no hospedeiro vertebrado (Fig. 3). Dentro dele, os parasitos entram em contato com células do sistema fagocitário mononuclear, onde são internalizados. Formam-se vacúolos intracelulares, onde os tripomastigotas começam a se diferenciar em amastigotas, enquanto a membrana do vacúolo vai se desestabilizando até completa dissolução. As formas amastigotas, agora livres no citoplasma, começam a se multiplicar. Após intensa multiplicação, as formas amastigotas começam a se diferenciar

em tripomastigotas, que chegam à corrente sanguínea após a ruptura da célula hospedeira. Esses tripomastigotas, no sangue, podem atingir outras células e tecidos, fazendo um novo ciclo intracelular, ou podem ser ingeridos por um triatomíneo, completando o ciclo (BRENER, 1972).



**Figura 2:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado. Adaptado de NEVES, 2000.



**Figura 3:** Ciclo do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado. O parasito se adere à superfície celular (A) e inicia o processo de internalização via pseudópodes (B) ou depressão na superfície celular (C). Os lisossomos se fundem à membrana do vacúolo (D) e as formas tripomastigotas vão perdendo o aspecto alongado, iniciando a diferenciação em amastigota, enquanto a membrana do vacúolo começa a se desestabilizar (E) até completa dissolução e liberação das formas amastigotas livres no citoplasma (F). Essas formas amastigotas começam a se multiplicar (G) e após intensa multiplicação, começam a se diferenciar em tripomastigotas (H, I), que chegam à corrente sanguínea após a ruptura da célula hospedeira (J). Adaptado de NEVES, 2000.

## 1.2. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses

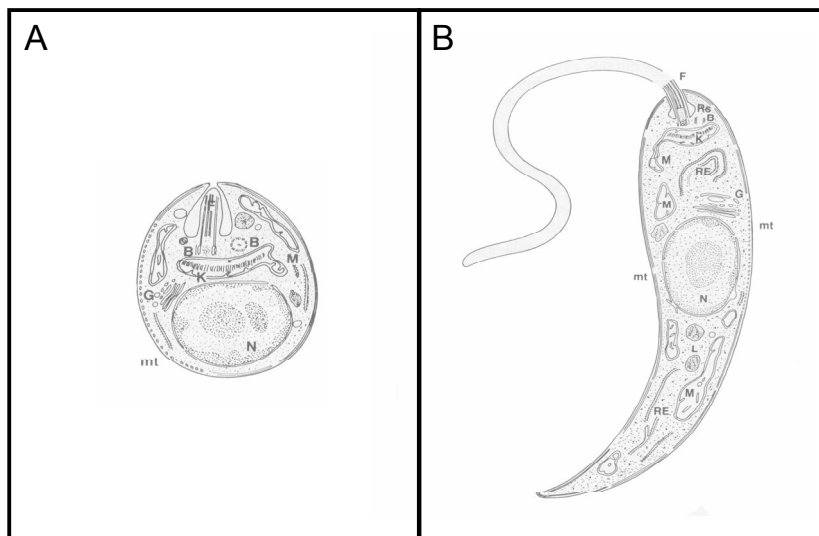
As leishmanioses são as mais importantes doenças emergentes e estão em segundo lugar no número de mortes, entre as doenças parasitárias, logo depois da malária. As leishmanioses são causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de insetos dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Há cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas. A Bolívia, o Brasil e o Peru contabilizam 90% de todos os casos mundiais. A forma mais perigosa da doença é a leishmaniose visceral (LV), que está entre as seis doenças mais importantes causadas por protozoários no mundo, devido a sua incidência, alta mortalidade em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, e emergência em indivíduos portadores da infecção por HIV. As leishmanioses têm ampla distribuição geográfica, ocorrendo em 88 países da Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas; afetam 12 milhões de pessoas e estima-se a ocorrência de 500 mil novos casos por ano, sendo que 90% deles em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (<http://www.who.int/en/>).

Dentre as espécies deste gênero, cerca de 20 são capazes de causar doença no homem. Diversas espécies de *Leishmania* são capazes de gerar diferentes formas da doença, e devido a essa diversidade de manifestações clínicas, as leishmanioses foram divididas em 4 grupos (DESJEUX, 2004):

- Leishmaniose cutânea: provoca lesões na pele, que podem ou não ser ulcerosas, na maioria das vezes é autolimitante, mas podem ocorrer formas mais severas.
- Leishmaniose muco-cutânea: forma desfigurante da doença, que provoca destruição das mucosas do nariz, boca e faringe, podendo levar à morte por infecção secundária das vias respiratórias.
- Leishmaniose visceral ou calazar: é considerada a forma mais grave, pois costuma ser fatal se não tratada; os parasitos apresentam tropismo por células do sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides.
- Leishmaniose cutânea difusa: é uma forma disseminada da cutânea, aparece em indivíduos com deficiência na resposta imune celular, ou tardiamente em indivíduos tratados de calazar.

A classificação das espécies de *Leishmania* foi muito controversa, e em 1987 Lainson e Shaw propuseram uma nova classificação (MICHALICK, 2000), onde as espécies que parasitam o homem foram divididas em dois subgêneros, de acordo com o local de desenvolvimento no aparelho digestivo do inseto vetor (Tabela 1). As espécies que atingem o intestino posterior do vetor (peripilárias) foram agrupadas no subgênero *Viannia*, e as espécies que ficam restritas às porções anterior e média do intestino do vetor (suprapilárias) foram agrupadas no subgênero *Leishmania* (GOSSAGE, ROGERS & BATES, 2003). Apesar de estudos posteriores indicarem que o local de desenvolvimento no intestino do vetor pode ser afetado por diferentes fatores, não sendo assim uma boa base para taxonomia (ANEZ, NIEVES & CAZORLA, 1989; WALTERS, 1993), esta classificação é adotada até hoje pela maioria dos autores.

As espécies de *Leishmania* apresentam 2 principais formas evolutivas durante seu ciclo de vida (GRIMALDI & TESH, 1993): a forma amastigota (Fig. 4A) e a forma promastigota (Fig. 4B), que se caracteriza por apresentar corpo celular alongado e achatado, com núcleo na porção média do corpo celular e cinetoplasto próximo à extremidade anterior, de onde emerge o flagelo.



**Figura 4:** Formas evolutivas da *Leishmania*. **A:** amastigota, **B:** promastigota. Adaptado de DE LANA & TAFURI, 2005.



Tabela 1: Classificação das principais espécies de *Leishmania*. \* espécies encontradas no Brasil.

---

SUBGÊNERO *LEISHMANIA*

---

**Complexo *Leishmania donovani***

*L. donovani*

*L. infantum*

*L. chagasi* \*

Possível membro

*L. archibaldi*

Espécies fora do complexo *donovani*

*L. tropica*

*L. aethiopica*

*L. major*

---

**Complexo *Leishmania mexicana***

*L. mexicana* \*

*L. amazonensis* \*

*L. venezuelensis*

*L. aristidesi*

Possíveis membros

*L. pifanoi*

*L. garnhami*

---

SUBGÊNERO *VIANNIA*

---

**Complexo *Leishmania braziliensis***

*L. braziliensis* \*

*L. guyanensis* \*

*L. panamensis*

*L. peruviana*

*L. lainsoni* \*

*L. naiffi* \*

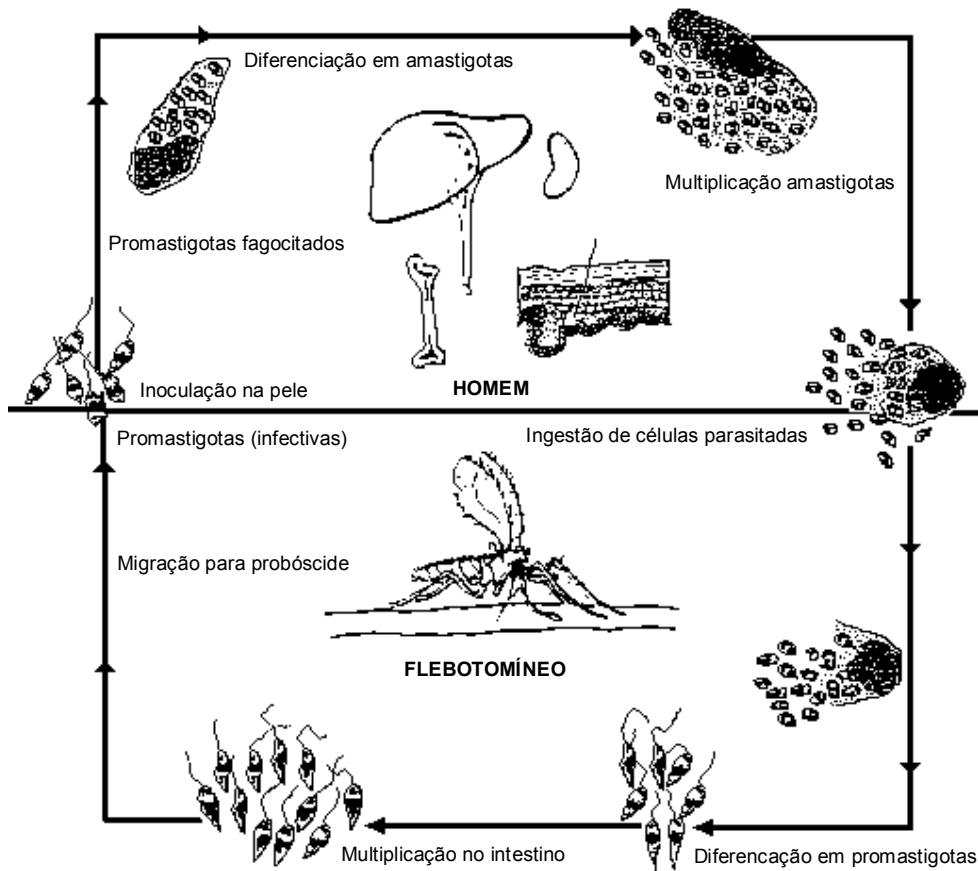
*L. shawi* \*

*L. colombiensis*

---

(adaptado de NEVES, 2000)

Os hospedeiros invertebrados são insetos conhecidos como flebotomíneos. O ciclo da *Leishmania* no inseto se inicia quando a fêmea (os flebotomíneos machos não são hematófagos) pica um hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo junto com o sangue as formas amastigotas do parasito (Fig. 5). No interior do aparelho digestivo do flebotomíneo, os parasitos se diferenciam em promastigotas procíclicos e se multiplicam ativamente. Esta multiplicação ocorre quando os parasitos ainda estão confinados ao sangue ingerido, pela membrana peritrófica. Estas formas promastigotas se tornam alongadas, sendo chamadas de promastigotas nectomonas. Estas formas escapam da membrana peritrófica, pela ação de uma quitinase produzida pelas formas promastigotas (SCHLEIN, JACOBSON & SHLOMAI, 1991; SOARES *et al.*, 2002), e podem de ligar ao epitélio do intestino médio posterior via flagelo, ou migrar para a região anterior do intestino, onde se diferenciam em promastigotas haptomonas e se ligam à superfície da válvula estomacal que une o intestino médio posterior ao anterior. Quitinases produzidas pelos parasitos irão danificar permanentemente esta região, permitindo a passagem dos parasitos numa próxima alimentação do vetor, momento este em que a válvula se encontraria fechada para impedir a passagem do conteúdo do aparelho digestivo (BATES, 1994). Durante a diferenciação em promastigotas metacíclicas, a lipofosfoglicana (LPG), molécula responsável pela adesão, sofre modificações que permitem o desligamento do parasito e a migração para as regiões anteriores do trato digestivo, permitindo sua transmissão durante nova alimentação do vetor (PIMENTA *et al.*, 1992). Quando são inoculados no hospedeiro vertebrado, os parasitos são fagocitados por macrófagos e se diferenciam em amastigotas, dentro do fagolisossoma. Estas formas se multiplicam até romper as células, liberando as amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos. Nesta etapa, um flebotomíneo, ao picar o hospedeiro vertebrado infectado, irá ingerir as formas amastigotas (livres ou dentro dos macrófagos), dando continuidade ao ciclo (ILG, 2001).



**Figura 5:** *Leishmania* spp: ciclo biológico. Adaptado de MICHALICK, 2005.

### 1.2.1. *Leishmania chagasi*

A leishmaniose visceral é causada pelas espécies do complexo *L. donovani*. Nesta doença, os parasitos apresentam tropismo pelas vísceras, principalmente órgãos linfóides como medula, baço, fígado e linfonodos. Esta doença se distribui por 88 países, porém cerca de 90% dos casos se concentram em apenas 5, que são Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. Devido à gravidade desta doença, são registradas 59.000 mortes por ano, com incidência de 500.000 novos casos (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006).

A *L. chagasi* é considerada como a única causadora da leishmaniose visceral na América Latina (Novo Mundo), as outras espécies estão

relacionadas com o calazar ou leishmaniose visceral do Velho Mundo (*L. donovani* na Índia e *Leishmania infantum* na região do Mar Mediterrâneo, Europa, África e China). A espécie de flebotômíneo responsável pela transmissão da *L. chagasi* é *Lutzomyia longipalpis* (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002), a Leishmaniose Visceral Americana (LVA) apresenta uma incidência de aproximadamente 4000 casos por ano. No Brasil são registrados cerca de 3500 casos, cerca de 90% do total de casos de toda América Latina (QUEIROZ, ALVES & CORREIA, 2004), e grande parte dos casos acomete crianças menores de 5 anos, moradoras de áreas rurais com baixa renda familiar (JERÔNIMO *et al.*, 2004; REY *et al.*, 2005). Uma característica da LVA no Brasil é a alta incidência de casos assintomáticos (COSTA *et al.*, 2002).

## **2. Insetos vetores**

### **2.1. Os Triatomíneos**

Dentre os hemípteros pertencentes à família Reduviidae, os triatomíneos (sub-família Triatominae) são os únicos representantes hematófagos, somando cerca de cento e quarenta espécies descritas (JUÁREZ & FERNÁNDEZ, 2007). Eles possuem grande importância médica, por agruparem espécies vetoras do *T. cruzi*, causador da doença de Chagas. Todas as espécies de triatomíneos são potencialmente vetoras do *T. cruzi*, só que poucas delas são importantes do ponto de vista epidemiológico (SHERLOCK, 1979). A relevância das espécies como vetoras da doença de Chagas está relacionada à habilidade de adaptação dos insetos ao habitat humano.

Os triatomíneos estão divididos em 6 tribos que agrupam 18 gêneros (CARVALHO *et al.*, 1997; CARCAVALLO *et al.*, 2000; HYPISA *et al.*, 2002):

- a) Alberproseniini: gênero *Alberprosenia*.
- b) Bolboderini: gêneros *Bolbodera*, *Belminus*, *Microtriatoma* e *Parabelminus*.
- c) Cavernicolini: gênero *Cavernicola* e *Torrealbaia*
- d) Linshcosteini: gênero *Linshcosteus*.

e) Rhodniini: gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes*.

f) Triatomini: gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Hermanlentia*, *Meccus*, *Mepraia* e *Paratriatoma*.

As tribos Rhodniini e Triatomini agrupam as principais espécies, sendo os gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* os de maior importância do ponto de vista epidemiológico.

Todo triatomíneo precisa realizar a hematofagia para completar seu ciclo de vida e procriar, tanto os machos quanto as fêmeas. São paurometabólicos, isto é, possuem metamorfose incompleta, passando por fase de ovo, ninfa e adulto, sendo que as ninfas possuem desenvolvimento gradual, vivendo no mesmo ambiente e tendo os mesmos hábitos que os adultos (NEVES, 2000). Da fase de ovo até a fase adulta, os triatomíneos passam por 5 estágios ninfais, realizando 5 mudas (Fig. 6). Para que ocorra a mudança de fase, é preciso que seja feito repasto sanguíneo (um único repasto pode ser suficiente para ecdise), da mesma forma, a fase adulta precisa de sangue para reprodução (GARCIA & AZAMBUJA, 1979, 1991).

Devido ao fato dos triatomíneos se alimentarem exclusivamente de sangue durante todo seu desenvolvimento, sua dieta é deficiente em certos nutrientes e vitaminas. Conseqüentemente, esses insetos abrigam uma população de bactérias simbiotes em seu trato digestivo, que fornecem os nutrientes necessários que faltam na sua alimentação (DASCH, WEISS & CHANG, 1984). Essas bactérias simbiotes crescem após a ingestão de sangue, se desenvolvem, e são transmitidas eficientemente através da coprofagia. Insetos que por algum motivo não se tornam colonizados por essas bactérias apresentam alta taxa de mortalidade entre as mudas e não conseguem chegar ao estágio adulto (BEARD *et al.*, 2001).



**Figura 6:** Esquema dos estágios do *R. prolixus*. Da esquerda para direita: ovo, ninfas de 1º, 2º, 3º, 4º e 5º estágio, adulto macho e fêmea.

A primeira bactéria simbiote caracterizada em triatomíneo foi *Rhodococcus rhodnii*, originalmente classificada como *Actinomyces rhodnii*, encontrada em *Rhodnius prolixus* (ERIKSON, 1935). Apesar de estudos subseqüentes demonstrarem a bactéria *R. rhodnii* como o principal simbiote em diferentes espécies de triatomíneos, Eichler (1998) identificou nos gêneros *Triatoma* e *Panstrongylus* outras espécies de actinomicetos simbiotes, como *Nocardia* sp. e *Gordonia* sp. Entre 95 e 99% da população de simbiotes em triatomíneos se desenvolvem na região anterior do aparelho digestivo (cárdia e estômago). A passagem do estômago, que é uma região de estoque, para o intestino, onde ocorre a digestão, causa uma considerável queda na população bacteriana, e praticamente nenhum simbiote é encontrado no reto.

Dentre os efeitos deletérios observados em insetos aposimbiontes, isto é, que não possuem bactérias simbiotes, se destacam: retardamento do desenvolvimento dos estádios de ninfa, aumento de taxa de mortalidade e distúrbios na digestão do sangue e na excreção. Todos esses efeitos são revertidos se os insetos aposimbiontes são infectados com seus respectivos simbiotes ou alimentados com dieta rica em vitaminas do complexo B (EICHLER & SCHAUB, 2002).

Os insetos hematófagos dependem de proteases para digerir as proteínas de seu repasto sanguíneo. A maioria dos dípteros utiliza proteases alcalinas para a digestão. Entretanto, os triatomíneos possuem um aparelho digestivo com pH ácido, e dependem principalmente de cisteína- e aspártico proteases para digestão. Foi identificado em *R. prolixus* atividade de catepsina B e D como principais proteases intestinais, enquanto que em *T. infestans* foram identificadas atividades de catepsina B e L (BORGES *et al.*, 2006; KOLLIEN *et al.*, 2004).

Além do papel na digestão do repasto sanguíneo, alguns autores têm sugerido que as proteases intestinais dos triatomíneos podem estar relacionadas com a infecção pelo *T. cruzi*, modulando sua sobrevivência e infectividade. Entretanto, poucos estudos foram feitos conectando as proteases do intestino dos triatomíneos e a infecção pelo *T. cruzi*. Borges e colaboradores demonstraram recentemente que a infecção por *T. cruzi* modula a atividade de catepsina D no intestino de *R. prolixus*, mas até o momento, nenhum estudo foi

realizado no intuito de verificar se as proteases do intestino dos triatomíneos são capazes de afetar a interação com o *T. cruzi* (BORGES *et al.*, 2006).

### **2.1.1. *Rhodnius prolixus***

Essa espécie é o principal vetor da doença de Chagas na Venezuela, Colômbia e Guiana. Em relação às espécies de triatomíneos envolvidas na transmissão do *T. cruzi*, *R. prolixus* possui tamanho médio, machos entre 17 e 20 mm de comprimento e fêmeas entre 19 e 22mm, e é considerado bastante ativo, deslocando-se com frequência entre os ambientes silvestres, peridomiciliares e domiciliares. Durante a alimentação, ingere grandes quantidades de sangue, até 10 vezes seu próprio peso (FRIEND, CHOY & CARTWRIGHT, 1965).

Dentre os fatores que tornam o *R. prolixus* uma espécie vetora importante, destacam-se: acentuada antropofilia, rápido ciclo de desenvolvimento, elevada densidade e alta susceptibilidade para albergar o *T. cruzi* (SHERLOCK, 1979).

### **2.1.2. *Triatoma infestans***

É considerado o principal vetor doméstico da doença de Chagas na América do Sul. Uma importante característica desta espécie é sua capacidade de atingir alta densidade populacional em áreas domiciliares. Original da Bolívia, o *T. infestans* também é encontrado no Paraguai, Argentina, Uruguai, Peru e Chile (DIOTAIUTI, PEREIRA & ESPÍNOLA, 2000). Esta espécie é predominantemente domiciliar, os machos atingem de 21 a 26 mm de comprimento e as fêmeas de 26 a 29 mm.

## **2.2. Os flebotomíneos**

São dípteros pertencentes à família Psychodidae, e a única sub-família de importância médica é a Phlebotominae. São holomatábolos, isto é, possuem metamorfose completa, passando por fase de ovo, larva (4 estágios), pupa e adulto (SOARES & TURCO, 2003). Apenas poucas espécies estão

relacionadas à transmissão das leishmanioses, sendo os 2 gêneros mais importantes *Lutzomyia* (Nas Américas) e *Phlebotomus* (Ásia, África e Europa).

Somente as fêmeas são hematófagas, e além de se alimentar de sangue, também necessitam de fontes de açúcares para seu metabolismo energético (CHANIOTIS, 1974). Já foi demonstrado que esta alimentação pode facilitar a transmissão da *Leishmania* no flebotomíneo. A ação de algumas quitinases produzidas pela *Leishmania* é inibida por produtos de degradação do sangue ingerido, sendo assim, esta nova alimentação serviria para “limpar” resíduos destas moléculas do intestino após a digestão do sangue, permitindo a ação das enzimas do parasito (SCHLEIN, JACOBSON & SHLOMAI, 1991; SCHLEIN, JACOBSON & MESSER, 1992; BARROS *et al.*, 2006). Além disso, como ocorre ingestão de saliva junto com o material ingerido pelo inseto (CAVALCANTE *et al.*, 2006), esta seria uma maneira de moléculas presentes na saliva entrarem em contato com os parasitos, sem a presença inibitória de produtos de degradação da hemoglobina. Tais moléculas poderiam então atuar diretamente na *Leishmania*, influenciando importantes etapas de seu desenvolvimento, como a metaciclogênese (CHARLAB & RIBEIRO, 1993; CHARLAB *et al.*, 1995).

Os flebotomíneos vetores de leishmanioses são, em muitos casos, apenas permissíveis para o desenvolvimento completo das espécies de *Leishmania* que eles de fato transmitem na natureza. As relações que controlam essa especificidade parasita-vetor estão relacionadas à habilidade dos parasitos de inibir ou resistir à morte por enzimas proteolíticas, liberadas pelo trato digestivo, logo após a alimentação dos insetos hematófagos, e/ou de manter a infecção no tubo digestivo, durante a excreção dos produtos de digestão do sangue (SACKS, 2001).

### **2.2.1. *Lutzomyia longipalpis***

Foi descrita por LUTZ & NEIVA, em 1912, capturada nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Já se suspeitava de seu envolvimento na transmissão da *L. chagasi*, pois sua distribuição geográfica coincidia com os locais de focos de LVA. Em 1977 foi realizada a primeira transmissão experimental bem



sucedida de *L. chagasi* pela picada de *Lu. longipalpis*, confirmando assim a suspeita desta espécie de flebotomíneo como vetora da LVA (LAINSON, WARD & SHAW, 1977). De fato, este é o flebotomíneo mais conhecido e mais bem estudado no mundo. Este fato faz com que seja utilizado em diversos estudos de interação com outras espécies de *Leishmania* das quais não é o vetor natural.

O uso de linhagens contínuas de células tem sido bastante difundido como ferramenta em diversos tipos de estudo. No caso de insetos, esta metodologia torna-se bastante atraente, devido à facilidade e praticidade em se manter uma cultura de células, quando comparado à manutenção de uma colônia de insetos em laboratório (FAMPA *et al.*, 2003). A primeira linhagem de células de inseto estabelecida foi de *Aedes aegypti* (GRACE, 1966). Desde então, foram estabelecidas culturas de células de uma variedade de insetos, como: *Culex* (KITAMURA, 1970), *Anopheles gambiae* (PUDNEY *et al.*, 1972; MARHOUL & PUDNEY, 1972), *Triatoma infestans* (PUDNEY & LANAR, 1977) e *Drosophila melanogaster* (DOLFINI, COURGEON & TIEPOLO, 1970). Porém, a primeira linhagem de flebotomíneo foi estabelecida somente em 1983, por Tesh e Modi, a partir de ovos de *Lu. longipalpis* coletados no Brasil. Esta linhagem foi chamada de LL-5. Quase duas décadas mais tarde, uma segunda linhagem foi desenvolvida (Lulo), a partir de tecidos embrionários de *Lu. longipalpis* (REY, FERRO & BELLO, 2000)

O principal uso das culturas de células de insetos está no estudo da sua interação com patógenos humanos, apesar de já ter sido demonstrada sua utilização em outras áreas, como na produção de proteínas recombinantes (HUMMEL *et al.*, 1992, MCCARROLL & KING, 1997).

### **3. Interação parasito-hospedeiro**

Sendo os tripanossomatídeos parasitos unicelulares que não possuem parede celular ou cápsula, a membrana celular é o primeiro ponto de contato com a superfície do hospedeiro, no momento da interação. Logo, é evidente que tanto a membrana celular do parasito, quanto da célula hospedeira, desenvolvem funções primordiais neste processo. Desta forma, destaca-se a

relevância dos estudos que visam detectar e caracterizar moléculas de superfície, que sejam diretamente responsáveis pelo início e/ou persistência de uma possível infecção (DE SOUZA, 1995).

Nas membranas celulares, os carboidratos estão ligados a proteínas ou lipídios, formando respectivamente glicoproteínas e glicolipídios, que são denominados genericamente de glicoconjugados. Reconhecidamente, os glicoconjugados de superfície exercem função primordial na interação entre diferentes tipos de parasitos e seus hospedeiros (KARISSON, 1989). Tal propriedade já foi evidenciada em diversos trabalhos, que mostram o envolvimento dessa classe de molécula em processos celulares relacionados ao reconhecimento, adesão, adsorção, penetração, apresentação e variação de antígenos e virulência (DE SOUZA, 1989 e 1995; PIMENTA *et al.*, 1992; MCCONVILLE, 1995; COLLI & ALVES, 1999; DESCOTEAUX & TURCO, 1999; MUKHOPADHYAY & MANDAL, 2006).

Em *T. cruzi*, a diferença de infectividade entre diversas cepas parece estar relacionada com a expressão diferencial de glicoconjugados de superfície. Acredita-se que uma glicoproteína de 82 kDa, presente na forma tripomastigota metacíclica, seja um ligante para receptores em células de mamíferos (RAMIREZ *et al.*, 1993; MANQUE *et al.*, 2000; CORTEZ, ATAYDE & YOSHIDA, 2006). Receptores para formas tripomastigotas em macrófagos e mioblastos provavelmente são glicoconjugados, contendo resíduos de manose e *N*-acetilglicosamina, e estes resíduos parecem ser importantes para a associação dos parasitos a estas células hospedeiras, já que o tratamento de macrófagos e mioblastos com manosidase e *N*-acetilglicosaminidase inibe a adesão dos parasitos (VILLALTA & KIERSZEBAUM, 1985). A expressão de transialidases em formas tripomastigotas de *T. cruzi* parece estar envolvida no escape dos parasitos do vacúolo parasitóforo (RUBIN-DE-CELIS *et al.*, 2006).

Também em diversas espécies do gênero *Leishmania*, glicoconjugados de superfície estão envolvidos em eventos relevantes na interação com seus hospedeiros invertebrados. Entre esses eventos estão o reconhecimento celular e adesão, especificidade por hospedeiros (PIMENTA *et al.*, 1992), proteção contra mecanismos de defesa (PUENTES *et al.*, 1990; SACKS *et al.*, 2000) e virulência (SOARES *et al.*, 2002; AMBROSIO & DE MESSIAS-RESON, 2005).

Os glicoconjugados de superfície de alguns tripanossomatídeos têm sido bastante estudados, sendo a citoquímica ultraestrutural e o uso de lectinas (proteínas com capacidade de ligação específica a determinados resíduos de açúcares) importantes ferramentas nesses estudos (MATTA *et al.*, 1999).

Pereira e colaboradores reportaram a existência de lectinas com diferentes atividades no estômago, intestino médio posterior e hemolinfa de *R. prolixus*. Açúcares ligantes para essas lectinas foram detectados em formas epimastigotas, mas não em tripomastigotas de *T. cruzi* (PEREIRA, ANDRADE & RIBEIRO, 1981). Estes autores sugerem que os parasitos se ligam às lectinas do tubo digestivo dos triatomíneos, enquanto sob a forma de epimastigotas e que, quando um novo resíduo de açúcar é adicionado à molécula original, ligante para a lectina do parasito, este se “desliga” do tubo digestivo do barbeiro. Cabe ressaltar que o último resíduo de açúcar é adicionado ao ligante para a lectina durante o processo de metaciclogênese do *T. cruzi*. Processos semelhantes foram descritos na interação de *Leishmania* com seu hospedeiro invertebrado, os flebotomíneos (BUTCHER *et al.*, 1996) e entre o parasito causador da malária, do gênero *Plasmodium*, com seu hospedeiro invertebrado, mosquitos do gênero *Anopheles* (SHAHABUDDIN & PIMENTA, 1998).

As lectinas vêm sendo usadas em flagelados da família Trypanosomatidae com várias finalidades, dentre elas a identificação de estruturas de superfície glicosiladas (MATTA *et al.*, 1999) e a identificação dos estágios de desenvolvimento (WILSON & PEARSON, 1984).

#### **4. Sinalização celular**

Todas as células recebem e respondem a sinais do meio ambiente em que vivem. A ligação de moléculas sinalizadoras aos seus receptores inicia a série de eventos intracelulares que regulam virtualmente todos os aspectos do comportamento celular, incluindo metabolismo, movimento, proliferação e diferenciação. Compreender os mecanismos moleculares responsáveis por essas vias de sinalização celular tornou-se, então, fundamental. O interesse por esta área é ainda maior, pelo fato que grande parte dos tipos de câncer é

resultante de falhas nas vias de sinalização, que controlam o crescimento e a diferenciação das células normais.

Os parasitos sofrem a influência de um vasto número de moléculas do meio externo durante seu ciclo de vida. Essas moléculas interagem com esses parasitos e exercem papel importante nos processos intracelulares, sendo responsáveis tanto por mudanças morfológicas quanto bioquímicas (FLAWIÁ, TÉLLEZ-IÑÓN & TORRES, 1997). Essas mudanças são mediadas pela ligação de moléculas aos seus receptores, iniciando uma série de reações dentro da célula, através de vias de transdução de sinais, que podem regular diferentes eventos, como expressão de fatores de virulência cruciais para a infectividade do parasito, proliferação, diferenciação e morte celular. Os mecanismos de sinalização podem envolver diversas moléculas, como proteínas G, mensageiros secundários, proteínas cinases e fosfatases (PARSONS & RUBEN, 2000).

São conhecidas duas principais vias de transdução de sinais: uma emprega a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e a outra usa a combinação de mensageiros secundários, incluindo íons  $Ca^{2+}$  e duas substâncias, o inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e o diacilglicerol (DAG). Nas duas vias é o receptor que transmite a informação, através da membrana plasmática, para dentro da célula por intermédio das proteínas G, que são ativadas quando se ligam a guanosina trifosfato (GTP). Estas proteínas ativam uma enzima amplificadora na parte interna da membrana, que converte moléculas precursoras em mensageiros secundários (VAN HAASTERT, 2006).

As vias de transdução de sinais que atuam na regulação de funções celulares envolvem rápida modificação de proteínas, pela adição ou remoção de grupamentos fosfato em resíduos de serina, tirosina e treonina. Sabe-se que, em eucariotos, diversas funções celulares são controladas pela fosforilação de proteínas. Este fato evidencia a participação de proteínas cinases e fosfatases e a importância de sua regulação durante o ciclo celular. É possível que as proteínas cinases de determinados patógenos sejam capazes não só de regular suas próprias atividades, mas também de regular funções das células hospedeiras (PARSONS, VALENTINE & CARTER, 1993).

Em sua grande maioria, os estudos sobre sinalização intracelular envolvendo tripanossomatídeos abordam as vias disparadas nas células

hospedeiras de mamíferos, em resposta à presença desses parasitos (BURLEIGH & ANDREWS, 1998). Desta maneira, pouco se sabe sobre a transdução de sinais que ocorre nesses parasitos, a partir de estímulos externos a eles, inclusive durante a interação com seus hospedeiros (PARSONS & RUBEN, 2000). Entretanto, foram observadas inúmeras diferenças marcantes entre o conjunto das proteínas cinases de humanos e as de tripanossomatídeos (NAULA, PARSONS & MOTTRAM, 2005). Assim, o estudo sobre as vias de sinalização intracelular de tripanossomatídeos, em especial no que diz respeito à participação das proteínas cinases, é de suma importância, porque as descobertas que se seguirem a esses estudos poderão levar ao desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas contra esses parasitos.

É conhecido que a interação de tripanossomatídeos com tecidos de vertebrados pode levar à ativação da sinalização intracelular, tanto nos parasitos quanto nas células hospedeiras, e que esta sinalização pode ser importante para o estabelecimento da infecção. Durante a interação de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* com células de mamíferos, ocorre a ativação de vias de sinalização intracelular, tanto no parasito quanto na célula hospedeira. Nas células hospedeiras, a ligação deste parasito promove uma cascata de sinalização, que leva ao rearranjo de microfilamentos (RODRIGUEZ *et al.*, 1995), recrutamento de lisossomas ao sítio de adesão (TARDIEUX *et al.*, 1992) e a internalização do parasito (ANDREWS, 1995). Em relação ao parasito, as informações acerca dos eventos ativados durante a interação de *T. cruzi* com células hospedeiras ainda são incipientes. No entanto, já se sabe que ocorre ativação de proteína tirosina cinase e mobilização intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$ , com envolvimento de fosfolipase C e  $\text{IP}_3$ , no parasito (YOSHIDA *et al.*, 2000). Em *L. donovani*, foi demonstrado que a ligação destes parasitos a componentes da matriz extracelular de tecidos pode interferir com a fosforilação endógena de proteínas, processo este que está relacionado com as vias de sinalização intracelular do parasito (LIRA, ROSALES-ENCINA & ARGÜELO, 1997).

## 6. Proteínas cinases

As proteínas cinases estão criticamente envolvidas em vários processos regulatórios (HUNTER, 1995; MANNING *et al.*, 2002). De acordo com as similaridades das seqüências de aminoácidos de seus sítios catalíticos, as proteínas cinases eucarióticas são classificadas em cinco grandes grupos: AGC, CaMK, CMGC, PTK e “outras”. O grupo AGC é representado pelas cinases dependentes de nucleotídeos (proteína cinase dependente de AMP cíclico, PKA, e proteína cinase dependente de GMP cíclico, PKG), as cinases dependentes de cálcio e fosfolipídios (proteína cinase C, PKC), além das cinases relacionadas à proteína S6 ribossomal. O grupo das CaMK é representado por proteína cinases dependentes de cálcio e calmodulina e o grupo das PTK é representado pelas tirosina cinases. O grupo coletivamente chamado de CMGC é representado pelas proteínas cinases dependentes de ciclinas (CDKs), cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), cinases associadas à glicogênio sintase (GSKs) e as cinases semelhantes às CDKs (CLKs). Dentre as cinases encontradas no grupo chamado de “outras”, temos as do grupo Ste (de estéril). Ste20 serina/treonina cinases regulam processos celulares fundamentais, tais como o ciclo celular, apoptose e resposta a estresse (STRANGE, DENTON & NEHRKE, 2006).

A proteína cinase CK2 (grupo CMGC) é amplamente difundida na natureza e constitutivamente ativada, fosforilando resíduos de serina/tirosina e está envolvida em um número imenso de processos celulares (MEGGIO & PINNA, 2003). Essa enzima é conhecida por estar engajada a vários processos regulados pelo desenvolvimento, tais como controle do ciclo celular e da diferenciação (LITCHFIELD, 2003). CK2 pode ser encontrada no núcleo, citoplasma (ALLENDE & ALLENDE, 1995) e também na superfície de células de mamíferos (WALTER, KINZEL & KUBLER, 1994).

Atividades de CK1 e CK2 foram descritas na superfície e sob a forma secretada em *Leishmania major* (SACERDOTI-SIERRA & JAFFE, 1997). Essas enzimas estão envolvidas com o crescimento celular e infectividade de *L. major* e *Leishmania amazonensis* (BECKER & JAFFE, 1997). Nosso grupo demonstrou a presença de CK2 no conteúdo citoplasmático de *Herpetomonas*

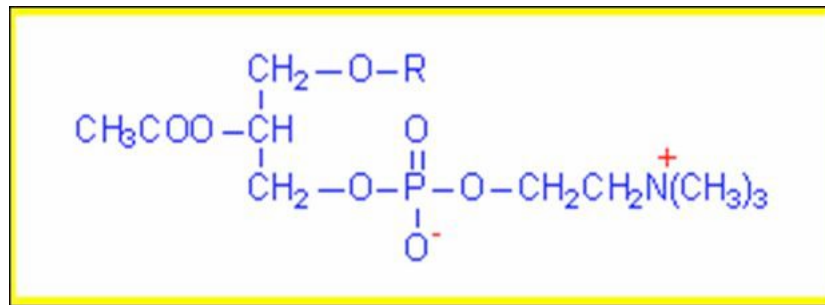
*muscarum muscarum* (SILVA-NETO *et al.*, 2002) e tanto na superfície quanto sob a forma secretada em *L. tropica* (DUTRA *et al.*, 2006).

O sequenciamento dos genomas de três tripanossomatídeos patogênicos para o homem, *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, já foi completado, o que permitiu a análise do conjunto de proteínas cinases (“kinoma”) de cada parasito (PARSONS *et al.*, 2005). Tal análise revelou que cada espécie possui 179, 156 e 171 proteínas cinases de eucariotos, respectivamente, o que representa cerca de um terço do “kinoma” humano. A análise revelou que os tripanossomatídeos não possuem membros das famílias de tirosina cinases citossólicas ou ligadas a receptores. Entretanto, esses parasitos apresentam membros das famílias de proteínas cinases STE e CMGC em abundância, que parecem estar envolvidos com a regulação do ciclo celular, diferenciação celular e resposta a estresse, durante seus complexos ciclos de vida (PARSONS *et al.*, 2005; NAULA, PARSONS & MOTTRAM, 2005).

Inibidores de proteínas cinases têm gerado grande interesse, devido ao grande sucesso de drogas como Gleevec e outros inibidores de tirosina cinases (TKs) em oncologia clínica (LI *et al.*, 2006). Interessantemente, parasitos da espécie *T. cruzi* possuem um grande número de diferenças gênicas entre suas proteínas cinases e a de mamíferos, que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas contra esse parasito (NAULA, PARSONS & MOTTRAM, 2005).

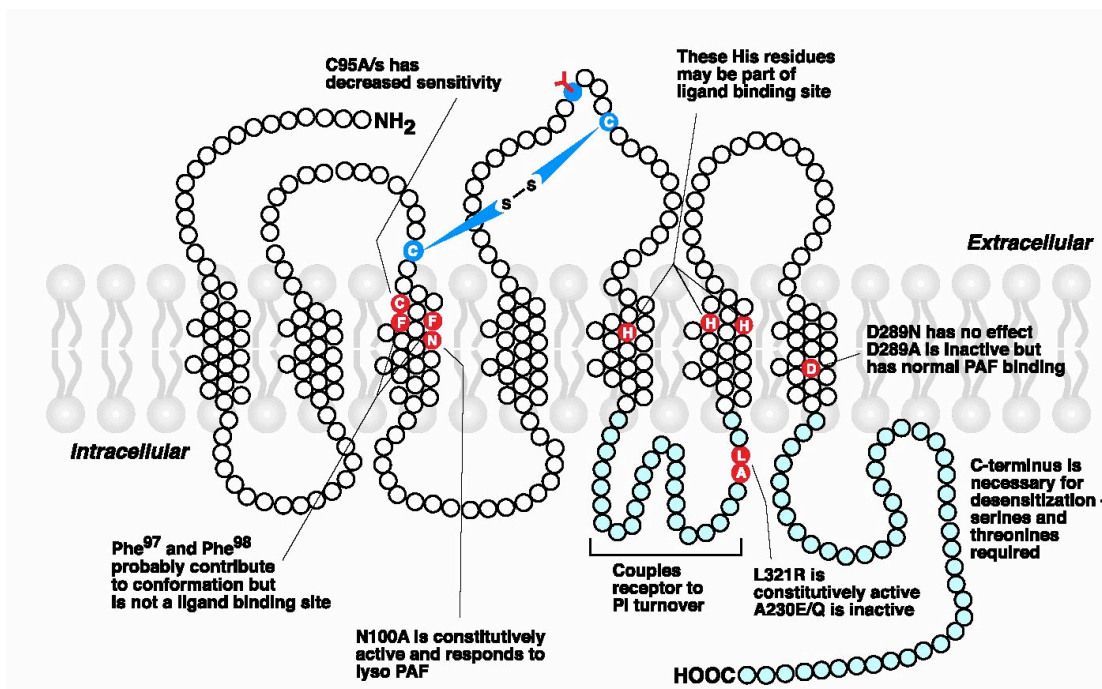
## **6. Fator de ativação de plaquetas (PAF)**

O fator de ativação de plaquetas (PAF), 1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina (Fig. 7), é um fosfolípido derivado da fosfatidilcolina, que foi descoberto na década de 70, como um fator solúvel liberado por leucócitos que induzia a agregação plaquetária de coelhos (BENEVISTE, HENSON & COCHRANE, 1972; CHAO & OLSON, 1993).



**Figura 7:** Estrutura do PAF

Inicialmente o papel do PAF era visto somente associado à agregação plaquetária, porém foi demonstrado que o PAF está envolvido em diversos processos biológicos e patofisiológicos, como inflamação, alergia e diferenciação celular (KULIKOV & MUZYA, 1997). O PAF é sintetizado por vários organismos, incluindo vertebrados, invertebrados, fungos e protozoários. Em mamíferos, é produzido por vários tipos celulares, como macrófagos, plaquetas, eosinófilos, neutrófilos, basófilos e células endoteliais (BOZZA *et al.*, 1994; CAMPBELL & HALUSHUKA, 1996).

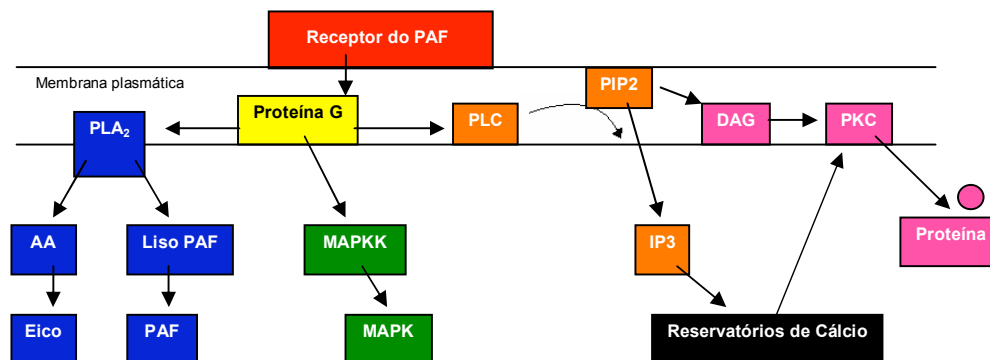


**Figura 8:** Esquema do receptor do PAF. Adaptado de PRESCOTT *et al.*, 2000.



O receptor do PAF (Fig. 8) teve seu gene clonado e seqüenciado (HONDA *et al.*, 1991), permitindo a elucidação de sua estrutura. Ele é formado por sete domínios transmembranares e uma porção citoplasmática, com resíduos de serina e treonina, possíveis sítios de fosforilação (ISHII & SHIMIZU, 2000).

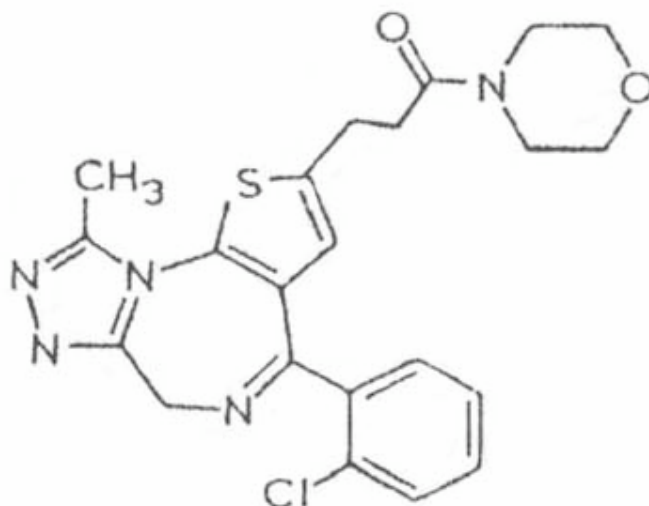
A atuação do PAF (Fig. 9) ocorre por meio da ligação ao seu receptor, que está associado à proteína G, levando a diversos efeitos bioquímicos como: ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, levando a produção de eicosanóides e PAF; ativação da via das MAP cinases; e ativação da fosfolipase C, que através da quebra de fosfatidilinositol bi-fosfato (PIP<sub>2</sub>) gera DAG e IP<sub>3</sub>; este último libera cálcio dos reservatórios celulares, que juntamente com o DAG irá ativar a PKC, que poderá fosforilar diversas proteínas (GOUILL *et al.*, 1997; ISHII, NAGASE & SHIMIZU, 2002).



PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; PLC: fosfolipase C; PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol bifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína cinase C; AA: ácido aracádônico; MAPKK: MAP cinase cinase; MAPK: MAPcinase; IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato; Eico: eicosanóides.

**Figura 9:** Esquema da via de transdução de sinais estimulada por PAF em células de mamíferos.

Uma ferramenta importante para o estudo da via de sinalização desencadeada pela ligação do PAF ao seu receptor é o WEB 2086 (3-[4-(2-clorofenil)-9-metil-6H-tieno-[3,2-f][1,2,4]triazolo-[4,3,α][1,4]diazepina-2-γ1-1-(4-morfolina-γ1)-1-propanona), que se liga ao mesmo receptor que o PAF, atuando como um antagonista específico (Fig. 10) (ISHII & SHIMIZU, 2000, ISHII, NAGASE & SHIMIZU, 2002).



**Figura 10:** Estrutura do antagonista do PAF, WEB 2086.

Em estudos anteriores de nosso laboratório, demonstramos que o PAF é capaz de induzir um aumento de 40% na diferenciação celular dos tripanossomatídeos *T. cruzi* (RODRIGUES *et al.*, 1996) e *H. m. muscarum* (LOPES *et al.*, 1997), com modulação de atividade fosfatásica na superfície dos parasitos (DUTRA *et al.*, 1998, 2000; RODRIGUES *et al.*, 1999). Sugerimos o envolvimento de transdução de sinais nesses sistemas, com participação de PKC (RODRIGUES *et al.*, 1999; SILVA-NETO, *et al.*, 2002). A PKC também parece estar envolvida no estímulo causado por PAF na interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais de camundongos (ROSA *et al.*, 2001). Recentemente demonstramos que o PAF é capaz de provocar um aumento na atividade de cinase secretada em *L. tropica*, e um aumento também na interação da *L. tropica* com macrófagos peritoneais de camundongos (DUTRA *et al.*, 2009). Também foi demonstrado em nosso laboratório que *T. cruzi* sintetiza um fosfolípido com atividade semelhante ao PAF (Tc-PAF), que é capaz de estimular a diferenciação celular do próprio parasito e a sua interação com macrófagos peritoneais de camundongos (GOMES *et al.*, 2006). Este foi o primeiro trabalho que evidenciou um lipídio intrínseco do parasito modulando, através da ligação ao receptor, sua

diferenciação e infectividade. De acordo com os trabalhos de nosso grupo, todos os efeitos do PAF em tripanossomatídeos, assim como os do Tc-PAF, parecem ocorrer via receptor de superfície, já que foram revertidos pelo antagonista de receptor de PAF, WEB 2086.

## II. PROPOSIÇÃO

A interação do *T. cruzi* com os vetores, ambos vertebrados e invertebrados, é extremamente importante para a sobrevivência do parasito, assim como fatores ambientais são extremamente importantes para a sobrevivência e desenvolvimento do inseto vetor. Tendo em vista que uma das principais estratégias de controle a doenças transmitidas por artrópodes é o combate aos vetores, fica evidenciada a importância de fatores ambientais, como por exemplo, a temperatura, para o desenvolvimento completo dos insetos vetores.

Assim, o **objetivo principal** deste trabalho foi avaliar o efeito da temperatura no desenvolvimento de *R. prolixus*, assim como analisar os efeitos do PAF na interação de *T. cruzi* e *L. chagasi* com seus respectivos hospedeiros invertebrados.

Como **objetivos específicos**, temos:

1. Comparar a sobrevivência e a postura de ovos de fêmeas de *R. prolixus* submetidas a diferentes temperaturas, assim como a viabilidade e o tempo de eclosão dos ovos;
2. Analisar o efeito da atividade da catepsina D presente no intestino de *T. infestans* sobre a população de bactérias simbiotes presentes no estômago do mesmo;
3. Acompanhar a infecção de *T. infestans* por *T. cruzi* e observar o número de parasitos, assim como a forma evolutiva em que eles se encontram durante a infecção;
4. Avaliar o efeito do PAF na interação de *T. cruzi* com *R. prolixus* “ex vivo”;

5. Verificar o efeito do PAF na interação de *T. cruzi* com o aparelho digestivo de *R. prolixus* “in vivo”;
6. Caracterizar o efeito do PAF e moduladores de sinalização intracelular na interação de *L. chagasi* com cultura de células de *Lu. longipalpis* “in vitro”.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Reagentes:

O fator de ativação de plaquetas (1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina), 5,6-dicloro-1-((-D-ribofuranosil) benzimidazole (DRB), bisindolilmaleimida I (BIS) e toxina pertussis foram obtidos de Calbiochem, San Diego, CA, USA. A neuraminidase tipo III de *Vibrio cholerae* foi obtida da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA. WEB 2086 (3-[4-(2-clorfenil)-9-metil-6H-tieno-[3,2-f] [1,2,4]triazolo-[4,3,a] [1,4] diazepine-2-g1-1-(4-morfoline-g1)-1-propanone), foi gentilmente cedido pelo Dr H. Heurer, de Boehringer Ingelheim, Alemanha. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 2. Parasitos:

##### *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas do clone Dm 28c foram mantidas por repiques semanais em meio LIT (Liver Infusion Trypticase) suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 28°C (RODRIGUES *et al.*, 1999), e utilizadas para estudos de interação com *R. prolixus*.

Na interação com *T. infestans*, foi utilizada a cepa Chile 5 (isolado de *T. infestans* originalmente coletados em Cachiyuyu, Chile) cedida pelo Dr. G. Schaub, da Ruhr Universität Bochum (RUB), Alemanha. Essa cepa foi mantida congelada a -80°C e descongelada antes do uso. Regularmente foram feitas passagens entre camundongos e o inseto vetor (EBERT & SCHAUB, 1983).

##### *Leishmania chagasi*

As formas promastigotas da cepa MHOM/BR/2000/MS501, isolada de um caso de leishmaniose visceral em Bodoquena, MT, em março de 1999, foram

mantidas por repiques semanais em meio Warren (WARREN, 1960) suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 28°C (MIRANDA *et al.*, 2004).

### **3. Insetos:**

#### ***Rhodnius prolixus***

Foram utilizadas fêmeas adultas da espécie *R. prolixus*, alimentadas a cada 3 semanas e mantidas sob condições laboratoriais a 28°C e 70% de umidade relativa, em insetário do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ (BRAZ *et al.*, 2001).

#### ***Triatoma infestans***

A colônia de *T. infestans* (originalmente coletados do mesmo local da cepa Chile 5 de *T. cruzi* no Chile) foi mantida a 26°C, 70% de umidade relativa e ciclo de luminosidade claro/escuro de 16h/8h (SCHAUB, 1988). Os insetos são alimentados com intervalos de aproximadamente 4 semanas em galinhas. Dependendo dos experimentos eles podem ser também alimentados em camundongos, ratos, galos ou artificialmente. Todos os experimentos envolvendo *T. infestans*, assim como a cepa Chile 5 de *T. cruzi*, foram realizados sob a supervisão do Dr. G. Schaub, na RUB, Alemanha.

### **4. Cultura de células de flebotomíneos:**

A cultura de células de *Lu. longipalpis*, originalmente obtidas a partir de ovos dos flebotomíneos (células LL-5), foi mantida por repiques semanais em garrafas de cultura com meio MM (Mitsubishi e Maramorosch) suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 26°C (FAMPA *et al.*, 2003).

### **5. Acompanhamento da postura e eclosão dos ovos de fêmeas de *Rhodnius prolixus* em diferentes temperaturas:**

Grupos de 30 fêmeas foram submetidos a diferentes temperaturas entre 10 e 40°C, variando a cada 2°C, imediatamente após a segunda alimentação. Os ovos foram contados e separados diariamente. Para verificar a viabilidade desses ovos, os mesmos foram deixados à temperatura ambiente para

acompanhamento da eclosão. Também foi analisada a taxa de mortalidade dessas fêmeas nas diferentes temperaturas.

Paralelamente, ovos de fêmeas controle (mantidas no insetário) foram coletados entre o 6<sup>o</sup> e o 7<sup>o</sup> dia após a 2<sup>a</sup> alimentação e colocados nas mesmas temperaturas entre 10 e 40°C para acompanhamento da eclosão.

Os valores da taxa ou frequência de eclosão foram obtidos dividindo-se o número de ovos eclodidos pelo número total de ovos postos.

#### **6. Ação da atividade enzimática intestinal sobre a população de simbioses em *Triatoma infestans*:**

Para se observar o efeito da atividade enzimática predominante no intestino dos insetos sobre as bactérias simbioses abundantes no estômago, diferentes sistemas foram utilizados, com o conteúdo do estômago e do intestino de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio de *T. infestans*, dissecadas no 7<sup>o</sup> dia após a alimentação, conforme a tabela abaixo:

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Estômago	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Intestino	–	5 µl	5 µl	–
Pepstatina A 100µM	–	–	1 µl	1 µl
Salina estéril	7 µl	2 µl	1 µl	6 µl

Os quatro sistemas foram incubados em triplicata por 2 horas a 37°C. Em seguida, as amostras foram diluídas em salina estéril a 1:100 e 1:1000, e plaqueadas em meio Agar nutritivo I em triplicata para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

#### **7. Infecção de *Triatoma infestans* por *Trypanosoma cruzi*:**

Ninfas de 1<sup>o</sup> estágio foram alimentadas em camundongos NMRI previamente infectados com a cepa Chile 5 de *T. cruzi*. Após a alimentação em camundongos, as ninfas foram posteriormente alimentadas em galinha, até chegarem ao 5<sup>o</sup> estágio.

As diferentes regiões do aparelho digestivo dos insetos: intestino médio anterior (estômago), intestino médio posterior (intestino) e intestino posterior (reto), foram dissecadas em 230µl de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% em diferentes dias após a alimentação e homogeneizados em homogeneizador de vidro Dounce em gelo. Uma alíquota foi retirada para contagem do número de células de *T. cruzi* em câmara de Neubauer. Foi feito também um esfregaço corado com Giemsa para determinação das formas evolutivas apresentadas pelo parasito.

#### **8. Tratamento de *Trypanosoma cruzi* com PAF e WEB2086:**

Epimastigotas de *T. cruzi* (clone Dm 28c) foram coletados por centrifugação, lavados 2 vezes com tampão salina fosfato 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7.2 (PBS) e incubados com PAF 10 µM ou WEB 2086 10 µM em meio LIT sem adição de soro. Após 1 hora de incubação, os parasitos foram lavados 2 vezes em PBS. Um grupo foi também pré-tratado com WEB por 1 hora, antes do tratamento com PAF, por mais 1 hora.

#### **9. Tratamento de *Trypanosoma cruzi* com neuraminidase:**

Os parasitos (clone Dm 28c) foram tratados com 0,2 U/ml de neuraminidase tipo III de *Vibrio cholerae* em PBS (pH 5,0 com CaCl<sub>2</sub> 4 mM) por 2 horas a 37°C. Esses parasitos foram pré-tratados ou não com PAF 10 µM, como descrito acima.

#### **10. Interação de *Trypanosoma cruzi* com intestino de *Rhodnius prolixus*:**

Os intestinos médio posterior e posterior de fêmeas de *R. prolixus* foram dissecados 11 dias após a alimentação e incubados individualmente por 1 hora num volume de 200 µl de PBS contendo  $2 \times 10^6$  epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram previamente tratados com PAF e/ou WEB 10 µM por 1 hora, ou com neuraminidase por 2 horas.

Após incubação, os intestinos foram lavados 3 vezes em PBS, homogeneizados individualmente em 100 µl de PBS e o número de parasitos contados em câmara de Neubauer.

### **11. Infecção de *Rhodnius prolixus* por *Trypanosoma cruzi*:**

Os insetos foram alimentados artificialmente com sangue de coelho, adicionado de  $2 \times 10^8$  epimastigotas de *T. cruzi* / ml, numa proporção de 0,2 ml de sangue por inseto (CABRAL *et al.*, 2001). Os parasitos foram pré-tratados ou não com PAF, WEB ou ambos ( $10 \mu\text{M}$ ) por 1 hora.

Os intestinos (médio e posterior) dos insetos foram dissecados 11 dias após a alimentação, homogeneizados em 100  $\mu\text{l}$  de PBS e observados ao microscópio óptico, para contagem do número de parasitos presentes, utilizando câmara de Neubauer.

### **12. Medida do potencial zeta:**

Os parasitos ( $2 \times 10^6$  /ml) foram fixados em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 com glutaraldeído 2,5%, e guardados em geladeira overnight. Na manhã seguinte, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e colocadas na câmara eletroforética de um equipamento de eletroforese celular (Rank Brothers II). A mobilidade eletroforética de pelo menos 40 células por grupo de amostra foi registrada sob um potencial de 100 mV, e os resultados foram convertidos em potencial zeta (SILVA-FILHO *et al.*, 1987).

### **13. Medida do ácido siálico:**

Os parasitos ( $10^9$  células de *T. cruzi*) foram ressuspensos em 2 mL de ácido fórmico pH 2,0 e aquecidos por 1 h a  $70^\circ\text{C}$ . As células foram recolhidas por centrifugação e o sobrenadante separado. O pellet foi submetido a uma segunda hidrólise com HCl 0,1 N por 1,5 h a  $80^\circ\text{C}$  (SOARES *et al.*, 2000). O sobrenadante de ambas as hidrólises foi combinado, liofilizado, e o conteúdo de ácido siálico foi medido colorimetricamente em espectrofotômetro pelo método do ácido tiobarbitúrico (WARREN, 1959).

### **14. Interação de *Leishmania chagasi* com células de *Lutzomyia longipalpis* LL-5:**

A cultura de LL-5 foi passada para lamínulas em placas de 24 poços a uma concentração inicial de  $2 \times 10^5$  células, num volume de 300  $\mu\text{l}$  de meio MM (com 10% de soro) por poço. As placas foram incubadas por 18 horas a  $28^\circ\text{C}$ .



Os parasitos foram adicionados às células aderidas a uma proporção de 10 parasitos por célula. Após 2 horas de incubação, as lamínulas foram lavadas 2 vezes em PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. Após a coloração, as células foram descoradas em solução de acetona com concentrações crescentes de xilol. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com Permount. O número de células infectadas e não infectadas e o número de parasitos foram contados em microscópio óptico.

Antes da incubação, os parasitos e / ou as células aderidas às lamínulas foram tratados por 1 hora com os seguintes moduladores: BIS I 20 nM (inibidor de PKC), TBB 20 nM (inibidor de CK2), 1 µg/ml de toxina pertussis (inibidor de proteína G inibitória) e/ou PAF10 µM. Os resultados foram expressos como índice de associação, que é obtido multiplicando a porcentagem de células infectadas pela média do número de parasitos aderidos por célula infectada.

#### **15. Análise estatística:**

Os resultados obtidos são relativos a uma média de pelo menos 3 experimentos. Os dados foram analisados utilizando o software PRISM (GraphPad Software, As Diego, CA). A análise comparativa entre os diferentes grupos foi feita com o uso do one-way ANOVA, seguido pelo teste de Turkey.

## **IV. RESULTADOS**

### **1. Oviposição e mortalidade de fêmeas de *Rhodnius prolixus* em diferentes temperaturas:**

A postura dos ovos de *R. prolixus* foi acompanhada durante 35 dias após a alimentação de grupos de 30 fêmeas submetidas à incubação em diferentes temperaturas entre 10 e 40°C, variando a cada 2°C. A temperatura mínima na qual as fêmeas foram capazes de colocar ovos foi de 18°C, porém, o número total de ovos foi muito reduzido, e o início da postura dos ovos foi tardio. O mesmo foi observado na temperatura de 20°C (Fig. 11a e 12). Entretanto, nenhuma fêmea foi encontrada morta durante os 35 dias de experimento nessas temperaturas.

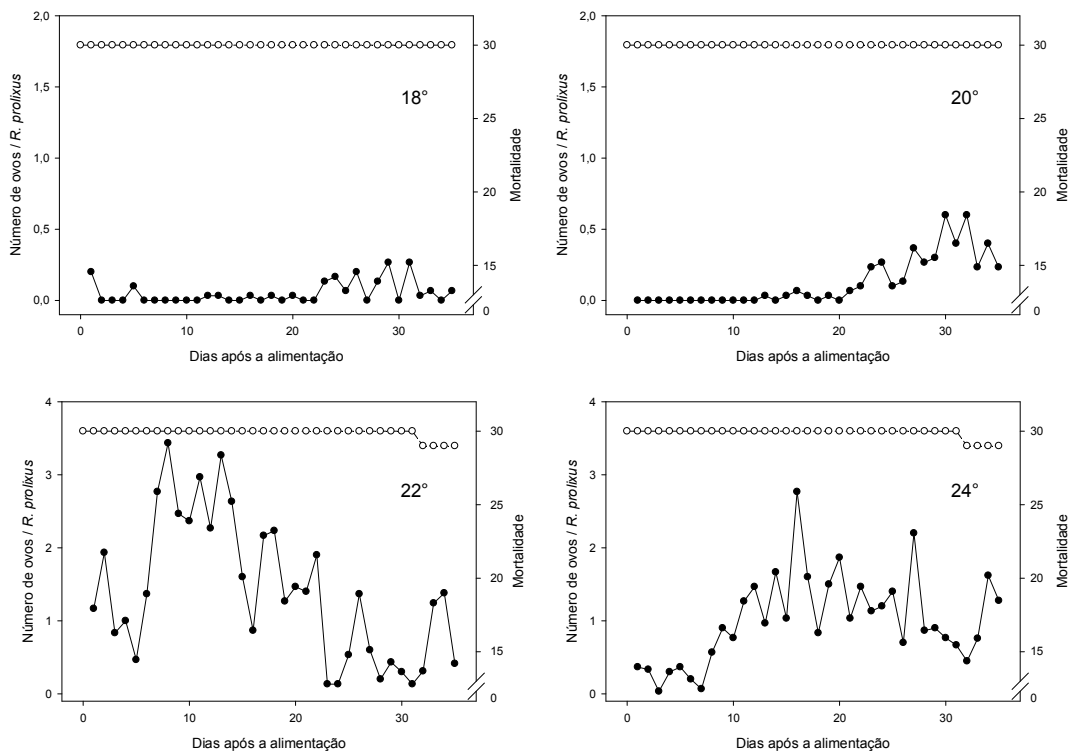


Fig. 11a: Oviposição e mortalidade de fêmeas de *R. prolixus*. Grupos de 30 fêmeas foram mantidos em temperaturas entre 18 e 24°C. O número de ovos postos e a mortalidade dessas fêmeas foram acompanhados durante 35 dias após a alimentação. ●: média de ovos postos por fêmea, ○: número de fêmeas viáveis.

Nas temperaturas de 22 e 24°C a postura de ovos se inicia mais cedo, e o número total de ovos postos é mais elevado do que quando comparado às temperaturas de 18 e 20°C (Fig. 11a). Na temperatura de 22°C o pico máximo de postura dos ovos ocorre no 8º dia após a alimentação, sendo que a maioria dos ovos é posta entre o 7º e o 14º dia. Já a 24°C o pico máximo de ovos é encontrado no 16º dia após a alimentação, sendo que a maioria dos ovos é colocada mais tardiamente em relação à temperatura de 22°C. Nessas duas temperaturas, uma única fêmea morreu no 32º dia após a alimentação.

Até o 30º dia após a alimentação todas as fêmeas se encontravam vivas na temperatura de 26°C. Nos últimos 5 dias do experimento, 9 fêmeas morreram. O pico máximo de postura foi observado no 14º dia, sendo que a maioria dos ovos foi posta entre o 9º e 19º dia (Fig. 11b).

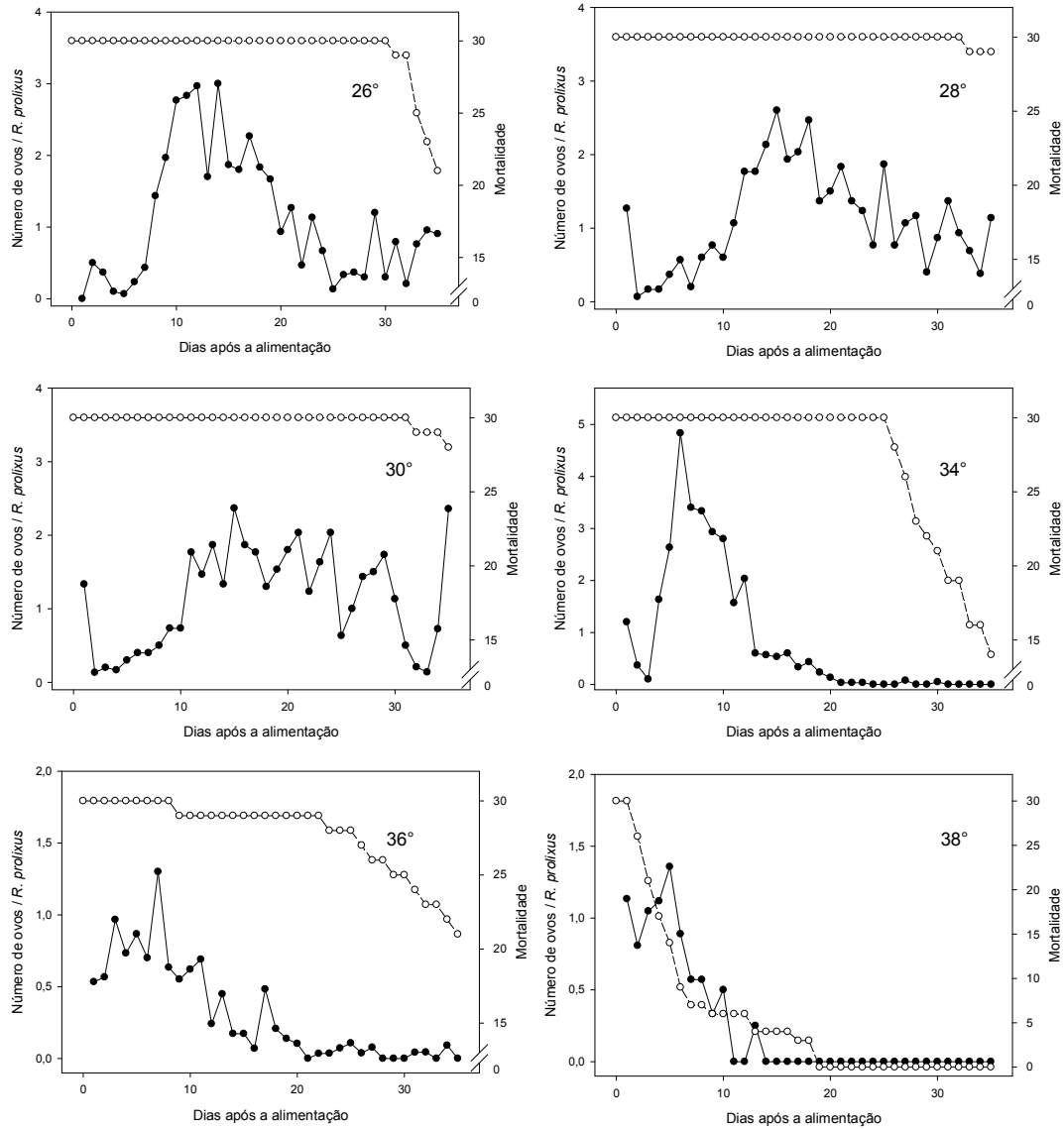


Fig. 11b: Oviposição e mortalidade de fêmeas de *R. prolixus*. Grupos de 30 fêmeas foram mantidos em temperaturas entre 26 e 36°C. O número de ovos postos e a mortalidade dessas fêmeas foram acompanhados durante 35 dias após a alimentação. ●: média de ovos postos por fêmea, ○: número de fêmeas viáveis.

Tanto o número total de ovos quanto o perfil de postura diária foi bastante semelhante nas temperaturas de 28 e 30°C. Em ambos os casos, o pico máximo de ovos postos foi visto no 15º dia após a alimentação. Somente uma fêmea morreu na temperatura de 28°C no 32º dia, enquanto que na temperatura de 30°C duas fêmeas morreram depois do 31º dia (Fig. 11b).

Na temperatura de 34°C ainda se tem um número razoavelmente grande de ovos colocados pelas fêmeas, porém a distribuição do perfil de postura se

encontra bastante deslocado, com o pico de postura no 6º dia, e uma brusca queda na postura de ovos a partir do 12º dia. Também se observa uma brusca queda no número de fêmeas vivas após o 25º dia após a alimentação (Fig. 11b).

Nas temperaturas de 36 e 38°C poucos ovos foram postos pelas fêmeas, porém esse número foi maior do que o demonstrado nas temperaturas de 18 e 20°C. Um total de 9 fêmeas morreram durante os 35 dias de incubação na temperatura de 36°C. Nessa temperatura o pico de postura foi observado no 7º dia após a alimentação, e somente poucos ovos foram postos após o 17º dia. Na temperatura de 38°C, a partir do 13º dia nenhum ovo foi posto, e a partir do 2º dia as fêmeas começaram a morrer, sendo que no 19º dia todas as fêmeas já estavam mortas (Fig. 11b). Após o 1º dia na temperatura de 40°C todas as fêmeas estavam mortas, e nenhum ovo foi encontrado (dados não mostrados).

A figura 12 mostra o total de ovos postos por fêmea nas diferentes temperaturas durante os 35 dias após a 2ª alimentação. A temperatura ótima para a postura de ovos foi de 22°C, sendo que até 34°C foi posto um elevado número de ovos. As fêmeas não foram capazes de colocar ovos em temperaturas abaixo de 18°C e acima de 38°C, e temperaturas próximas a esses extremos resultaram em uma diminuição no número de ovos. Todos esses ovos postos nas diferentes temperaturas foram coletados diariamente, e mantidos à temperatura ambiente para acompanhamento da viabilidade. A maior taxa de eclosão foi observada para a temperatura de 22°C. Essa taxa sofreu uma queda com o aumento da temperatura, chegando a zero na temperatura de 38°C. Isso significa que os ovos produzidos na temperatura de 38°C foram estéreis, visto que nenhum deles foi capaz de eclodir nas condições estudadas. A taxa de eclosão se manteve acima de 0,5, indicando que mais de 50% dos ovos eclodiram, entre as temperaturas de 22 e 30°C.

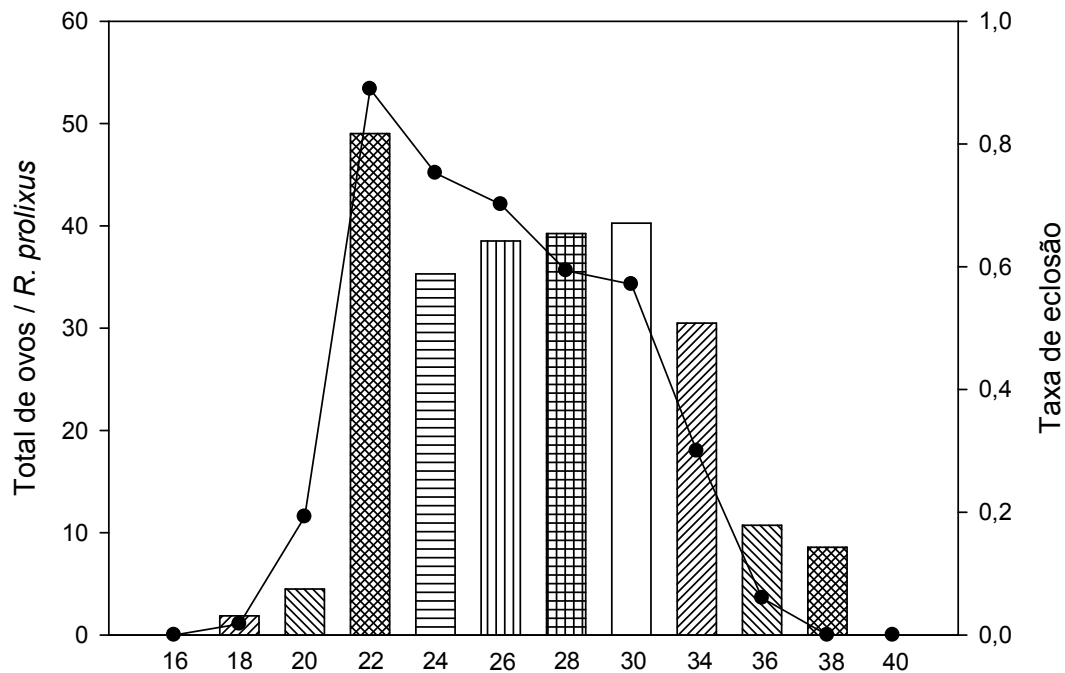


Fig. 12: Total de ovos postos (barras) e taxa de eclosão (linha) de *R. prolixus*. Grupos de 30 fêmeas foram mantidos em diferentes temperaturas entre 16 e 40°C. O número de ovos postos foi contado durante 35 dias após a alimentação e a viabilidade dos ovos foi acompanhada à temperatura ambiente.

O perfil de eclosão dos ovos nos diferentes dias após a postura é demonstrado na figura 13. Os ovos eclodiram entre o 11<sup>o</sup> e o 19<sup>o</sup> dia após a postura. Foi observado o maior tempo de eclosão nas temperaturas mais baixas. Nas temperaturas de 18 e 20°C o tempo médio de eclosão foi de 18 dias. O tempo de eclosão mais curto ocorreu nas temperaturas mais elevadas: 12 dias para a temperatura de 34°C e 14 dias para 36°C. Entre as temperaturas de 22 e 26°C os ovos demoraram entre 13 e 18 dias para eclodir, com um tempo médio de eclosão de 15 dias para a temperatura de 24°C, e 16 dias para 22 e 26°C. Os ovos colocados nas temperaturas de 28 e 30°C tiveram um tempo médio de eclosão de 17 dias.

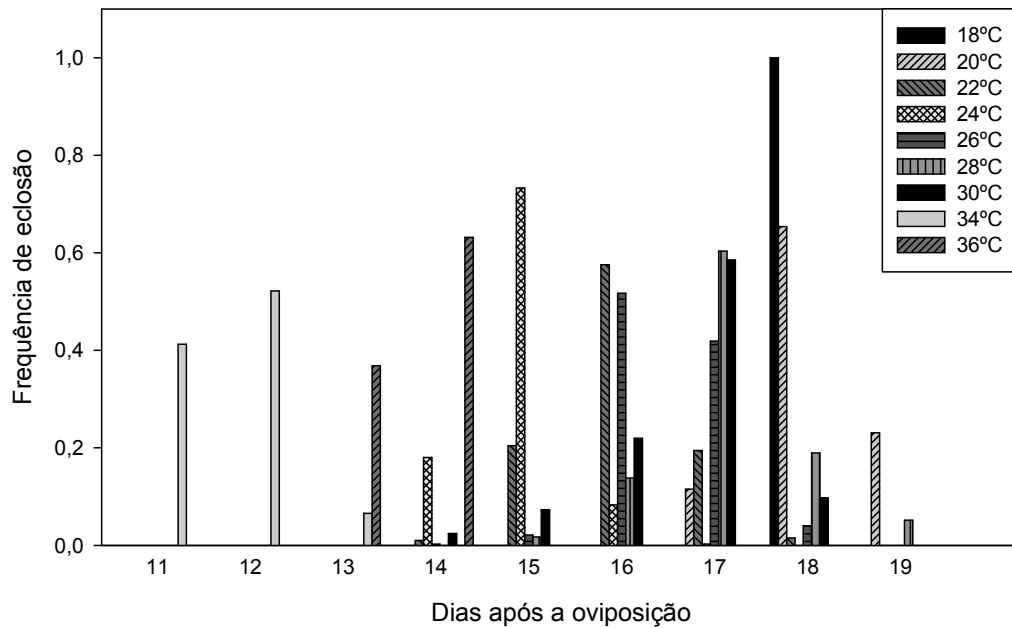


Fig. 13: Distribuição da eclosão dos ovos de *R. prolixus* à temperatura ambiente nos diferentes dias após a postura. A eclosão dos ovos postos pelas fêmeas em diferentes temperaturas foi acompanhada por até 3 semanas.

A figura 14 mostra o número total de ovos eclodidos nos diferentes dias após a postura, levando-se em consideração todas as temperaturas analisadas. Podemos observar que a maior parte dos ovos postos nas diferentes temperaturas e deixados em seguida à temperatura ambiente eclodiram no 16<sup>o</sup> dia após a postura. Um grande número de ovos eclodiu também no 15<sup>o</sup> e no 17<sup>o</sup> dia.

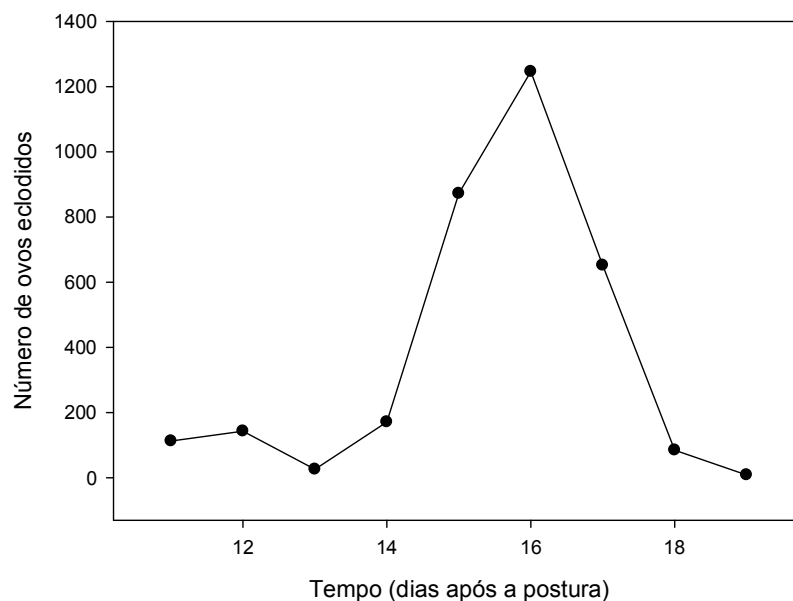


Fig. 14: Total de eclosão dos ovos de *R. prolixus* nos diferentes dias após a postura. O total de eclosão dos ovos postos pelas fêmeas em diferentes temperaturas foi somado de acordo com o dia de eclosão.

Os resultados do tempo de eclosão podem ser mais bem visualizados na Tabela 2. Nela se encontram, além da taxa de eclosão, os valores do tempo mínimo e máximo de eclosão para cada temperatura, assim como a média e a mediana.

Tabela 2: Tempo de eclosão dos ovos de *R. prolixus*. A eclosão dos ovos em temperatura ambiente foi acompanhada por até 3 semanas.

	taxa	Tempo (dias)			
		mín.	máx.	média	mediana
18°C	0,017	18	18	18	18
20°C	0,192	17	19	18,11	18
22°C	0,890	14	18	15,99	16
24°C	0,752	13	17	14,9	15
26°C	0,701	14	18	16,47	16
28°C	0,593	15	18	17,12	17
30°C	0,571	14	18	16,65	17
34°C	0,299	11	13	11,65	12
36°C	0,060	13	14	13,63	14

## 2. Eclosão dos ovos de *Rhodnius prolixus* em diferentes temperaturas:

A eclosão dos ovos de fêmeas controle, mantidas no insetário, foi acompanhada em diferentes temperaturas entre 10 e 40°C, variando a cada 2°C. A temperatura máxima na qual foi observada eclosão foi de 36°C, onde somente 5% dos ovos eclodiram (Fig. 15). Não foi observada eclosão nas temperaturas acima de 36°C.

A taxa de eclosão encontrada nas temperaturas entre 24 e 34°C foi bastante elevada, e acima de 80% dos ovos eclodiram, sendo que a única temperatura onde todos os ovos eclodiram foi a de 26°C. A faixa de temperatura de eclosão dos ovos foi bastante estreita, quando comparada à faixa de temperatura em que as fêmeas são capazes de colocar ovos. Nenhum ovo eclodiu nas temperaturas abaixo de 24°C.

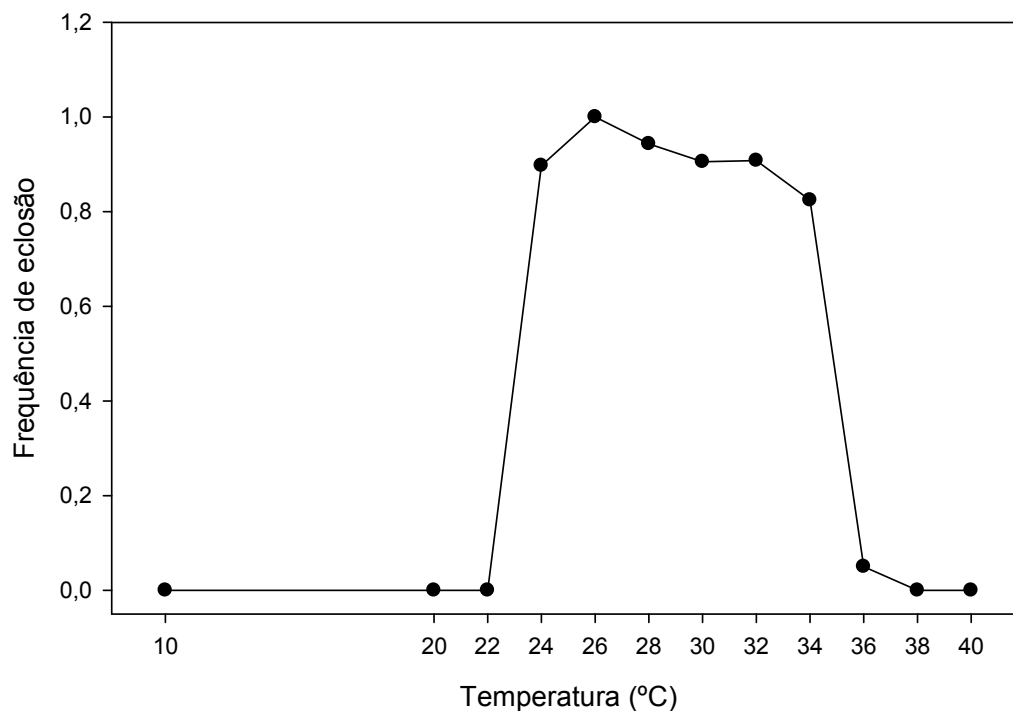


Fig. 15: Taxa de eclosão de ovos de *R. prolixus* em diferentes temperaturas. Ovos postos por fêmeas a 28°C foram colocados em diferentes temperaturas e a taxa de eclosão foi acompanhada.



É interessante observar que nas temperaturas de 18 e 20°C as fêmeas foram capazes de colocar ovos, mesmo que poucos, sendo que o pico máximo de postura de ovos foi observado na temperatura de 22°C (Fig. 12). Entretanto, como podemos observar na figura 15, nenhum ovo foi capaz de eclodir nessas mesmas temperaturas.

A figura 16 mostra a taxa de eclosão dos ovos distribuída pelos diferentes dias após a postura. Nas temperaturas de 24, 28 e 30°C os ovos tiveram tempo mínimo de eclosão de 13 dias, e máximo de 15 dias, com média entre 13 e 14 dias (Tabela 3). Na temperatura de 26°C, onde todos os ovos eclodiram, a maioria dos ovos eclodiu no 15º dia após a postura. Esta temperatura foi a única em que alguns ovos eclodiram do 16º ao 18º dia; em todas as outras temperaturas analisadas neste experimento, o tempo máximo de eclosão foi de 15 dias.

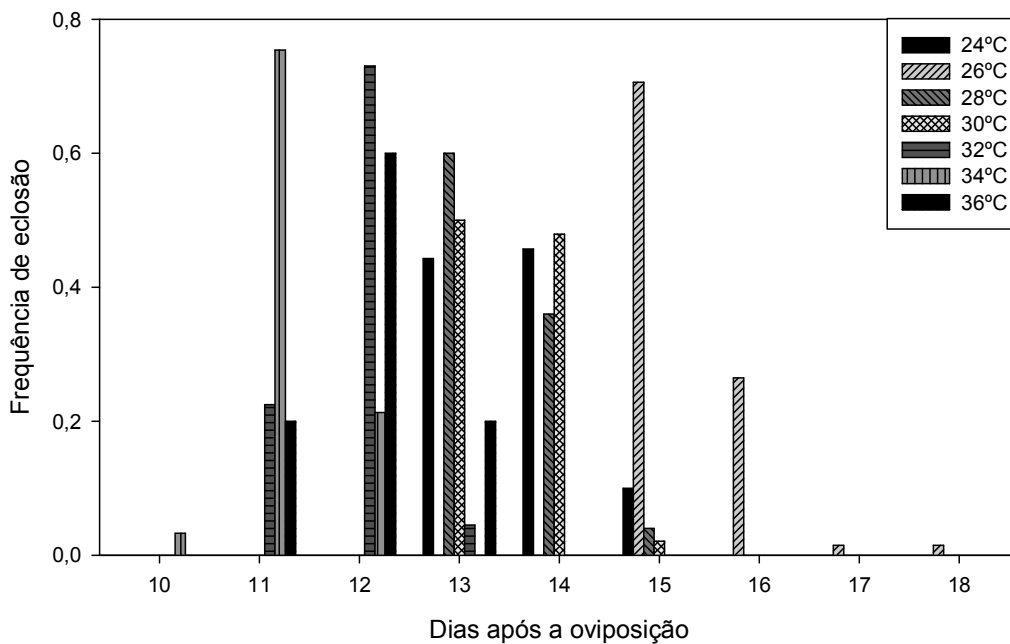


Fig. 16: Distribuição da eclosão dos ovos de *R. prolixus* nos diferentes dias após a postura. A eclosão dos ovos postos pelas fêmeas a 28°C foi acompanhada em diferentes temperaturas por até 3 semanas.

Podemos observar na figura 17 o número total de ovos eclodidos nos diferentes dias após a postura, levando-se em consideração todas as

temperaturas analisadas. Podemos observar que a maior parte dos ovos postos a 28°C e deixados em seguida em diferentes temperaturas eclodiram no 11<sup>o</sup> dia após a postura. A partir daí, o número de ovos eclodidos diminui constantemente no decorrer dos dias, até o 17<sup>o</sup> dia após a postura.

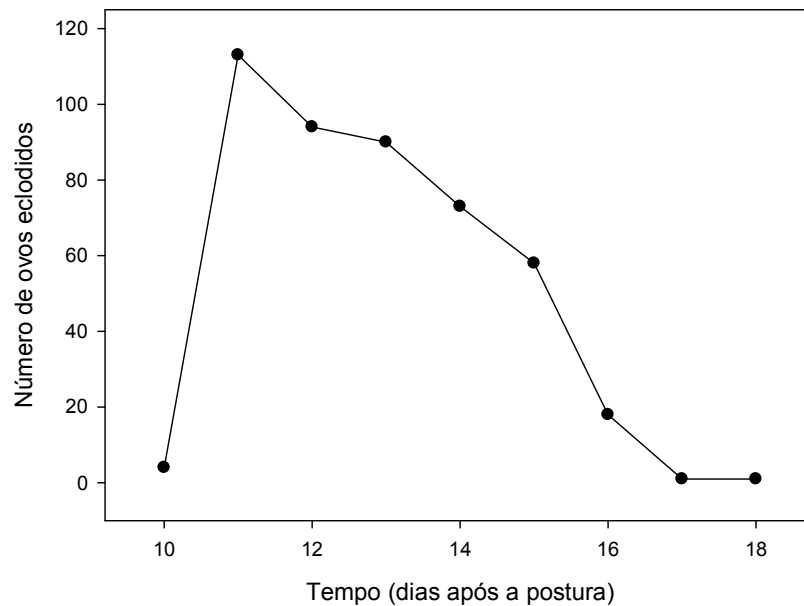


Fig. 17: Total de eclosão dos ovos de *R. prolixus* nos diferentes dias após a postura. O total de eclosão nas diferentes temperaturas dos ovos postos pelas fêmeas a 28°C foi somado de acordo com o dia de eclosão.

Dentro da faixa de temperatura em que ocorre a eclosão dos ovos, o tempo de eclosão tende a diminuir, de acordo com o aumento da temperatura. Na temperatura de 24°C, por exemplo, os ovos levaram uma média de 14 dias para eclodir, enquanto que na temperatura de 36° C, os ovos levaram 12 dias, em média (Tabela 3).

Tabela 3: Tempo de eclosão dos ovos de *R. prolixus*. A eclosão dos ovos foi acompanhada por até 3 semanas em diferentes temperaturas.

	taxa	Tempo (dias)			
		mín.	máx.	média	mediana
24°C	0,897	13	15	13,65	14
26°C	1	15	18	15,34	15
28°C	0,943	13	15	13,44	13
30°C	0,905	13	15	13,52	13,5
32°C	0,908	11	13	11,82	12
34°C	0,824	10	12	11,18	11
36°C	0,050	11	13	12	12

### 3. Ação da atividade enzimática do intestino sobre a população de simbioses de *Triatoma infestans*:

No intuito de caracterizar a ação da atividade de enzimas digestivas presentes no intestino dos triatomíneos sobre a população de bactérias simbioses, alíquotas do conteúdo estomacal, região onde as bactérias simbioses são abundantes, foram incubadas com diferentes sistemas e os resultados estão demonstrados na Figura 18.

A adição do conteúdo do intestino, rico em atividade de enzimas digestivas, provocou uma acentuada redução no crescimento das bactérias simbioses presentes no conteúdo do estômago. Esta redução foi inibida quando o mesmo sistema foi incubado juntamente com pepstatina 100  $\mu$ M, um inibidor de catepsina D, indicando que a redução provocada pela adição do conteúdo intestinal seja resultado da atividade desta enzima. Podemos dizer que a presença do conteúdo do intestino é capaz de alterar o crescimento das bactérias simbioses presentes no estômago de *T. infestans*.

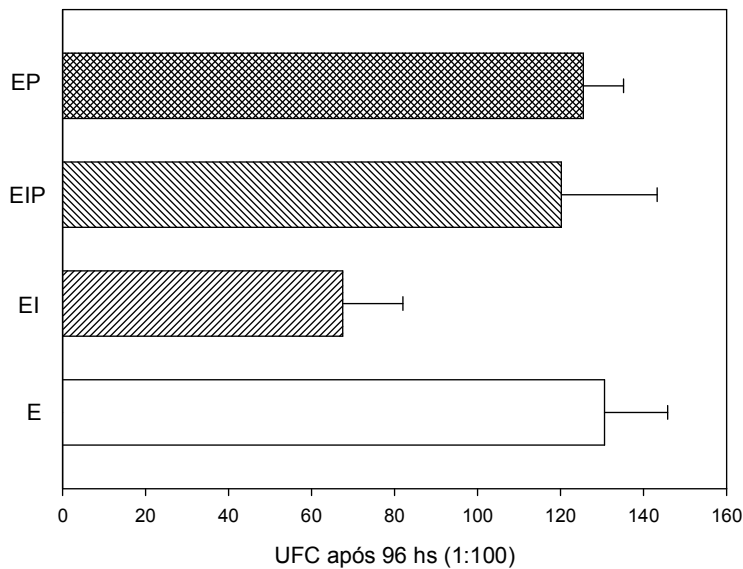


Fig. 18: Efeito da atividade enzimática do intestino sobre as bactérias simbiotas do estômago de *T. infestans*. E: controle, somente o conteúdo do estômago. EI: conteúdo do estômago + conteúdo do intestino. EIP: conteúdo do estômago + intestino + pepstatina (inibidor de catepsina D). EP: controle da pepstatina, contendo somente conteúdo do estômago + pepstatina. O número de UFC foi contado após 96 hs. O gráfico apresenta a média de 3 experimentos, realizados em triplicata.

#### 4. Interação de *Trypanosoma cruzi* (cepa Chile 5) com *Triatoma infestans*:

Neste experimento de interação, as ninfas de 5<sup>o</sup> estágio dissecadas haviam sido infectadas com *T. cruzi* logo na primeira alimentação como ninfas de 1<sup>o</sup> estágio. Depois da infecção, as ninfas infectadas foram mantidas com alimentação em camundongos não infectados, até o 5<sup>o</sup> estágio de ninfa. Após a muda para o 5<sup>o</sup> estágio, alguns insetos foram dissecados antes da alimentação, enquanto que os outros foram novamente alimentados e dissecados em diferentes dias após a alimentação.

Como esperado no caso de infecção antiga, não foram observados muitos parasitos presentes na região do estômago dos insetos em nenhum dos dias analisados (Fig. 19). Nos insetos em jejum, um grande número de parasitos foi visualizado no reto. Até o 5<sup>o</sup> dia após a alimentação, o número de parasitos no reto diminuiu, voltando a subir em níveis maiores que o

encontrado nos insetos de jejum no 10<sup>o</sup> dia após a alimentação. No intestino, a quantidade de parasitos era baixa nos insetos em jejum; esse número aumenta no 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> dia, e reduz aos níveis encontrados nos insetos em jejum no 5<sup>o</sup> dia após a alimentação. Porém, no 10<sup>o</sup> dia após a alimentação o número de parasitos no intestino aumenta até um nível próximo ao encontrado no reto. Não havia insetos suficientes para continuar a contagem por mais tempo.

O número de parasitos encontrados no estômago nas lâminas a fresco foi muito baixo, em consequência, muito poucas células puderam ser evidenciadas nas lâminas coradas com Giemsa. Devido a este fato, somente as amostras do intestino e do reto foram levadas em conta para a análise. As diferentes formas evolutivas encontradas estão ilustradas na figura 20.

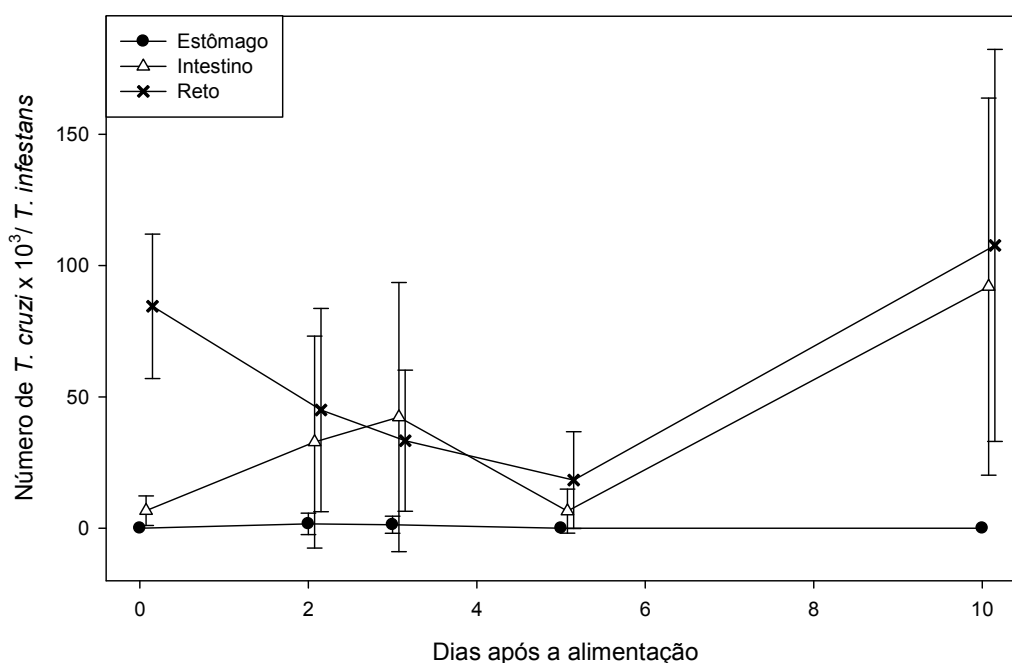


Fig. 19: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*. Ninfas de 1<sup>o</sup> estágio foram alimentadas em camundongos infectados pela cepa Chile 5 de *T. cruzi*. O aparelho digestivo foi dissecado em diferentes dias após a alimentação dos insetos como ninfas de 5<sup>o</sup> estágio e o número de parasitos presentes foi contado em câmara de Neubauer. É apresentada a média de pelo menos 5 insetos por ponto.

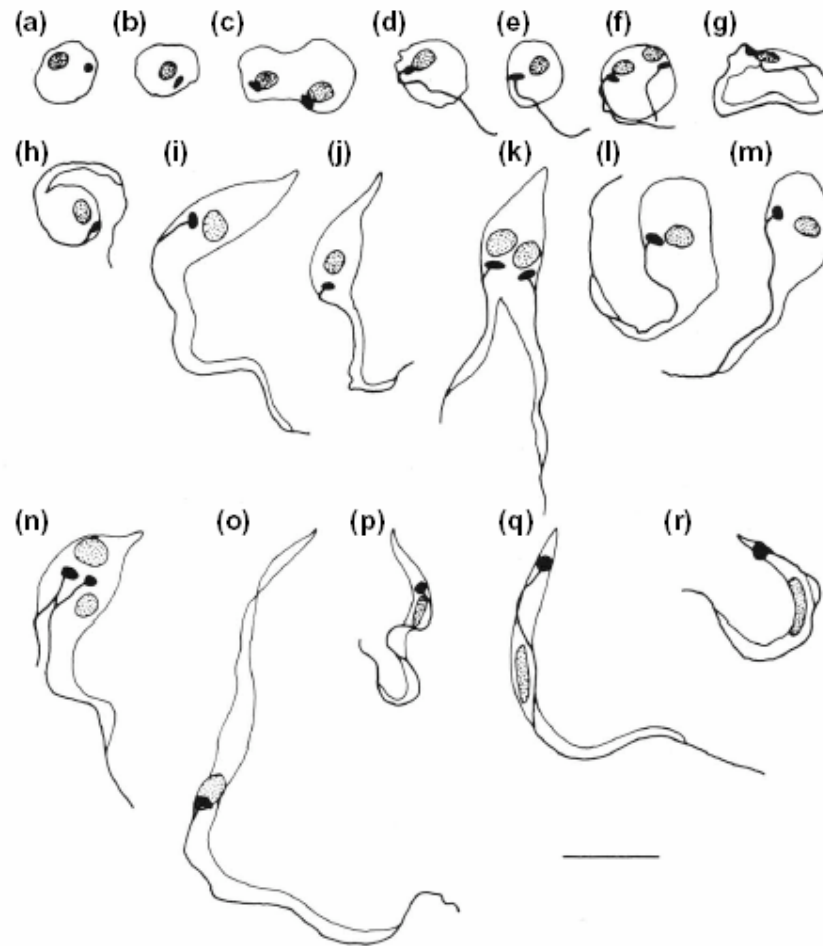


Fig. 20: Formas apresentadas pelo *T. cruzi* na interação com *T. infestans*. Amastigotas (a-c), esferomastigotas (d-f), formas intermediárias entre esferomastigota e epimastigota (g, h), epimastigotas (i-k), formas intermediárias entre esferomastigota (ou epimastigota) e tripomastigota (l, m), formas intermediárias entre epimastigota e tripomastigota (n-p) e formas tripomastigotas (q, r). Adaptado de Kollien & Schaub, 2000.

As formas amastigotas foram encontradas em baixo nível de um modo geral no intestino (Fig. 21). Já no reto, podemos observar pequenos picos nos insetos em jejum, e depois no 10<sup>o</sup> dia após a alimentação. Entretanto, foi encontrada uma maior quantidade de formas esferomastigotas (Fig. 22). A proporção de esferomastigotas no intestino foi um pouco alta até o 3<sup>o</sup> dia após a alimentação, e depois sofreu uma queda até o 15<sup>o</sup> dia. No reto, o número de esferomastigotas, que era mais alto nos insetos em jejum, sofreu uma queda após a alimentação dos insetos, e teve um elevado pico 10 dias depois.

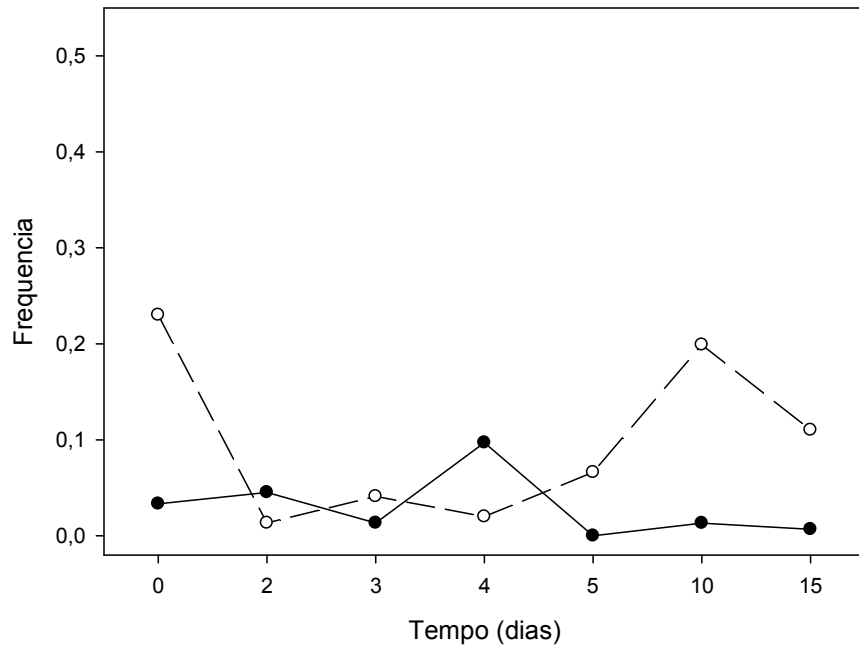


Fig. 21: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*: Amastigotas. O intestino e o reto de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas amastigotas de *T. cruzi* foram contadas. ●: intestino, ○: reto.

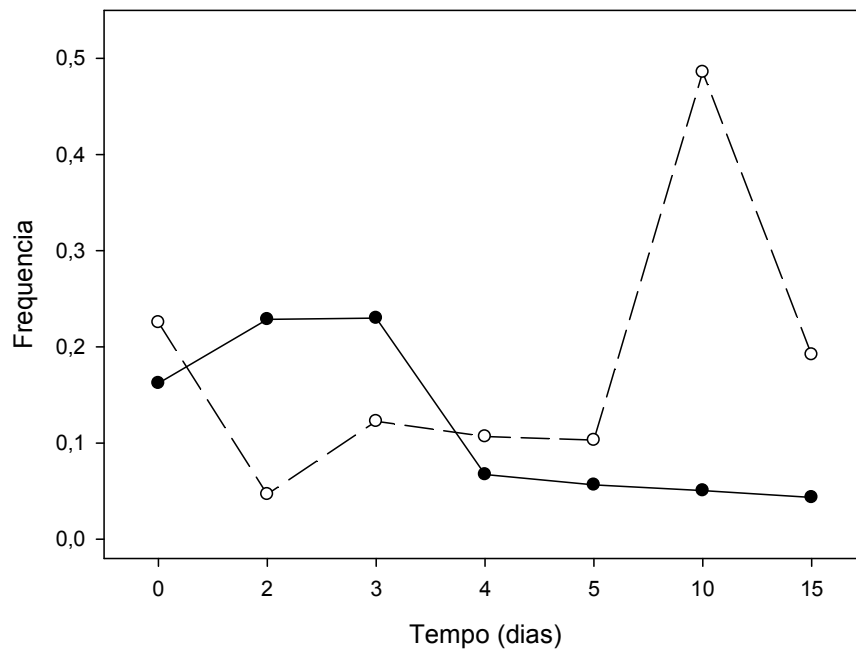


Fig. 22: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*: Esferomastigotas. O intestino e o reto de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas esferomastigotas de *T. cruzi* foram contadas. ●: intestino, ○: reto.

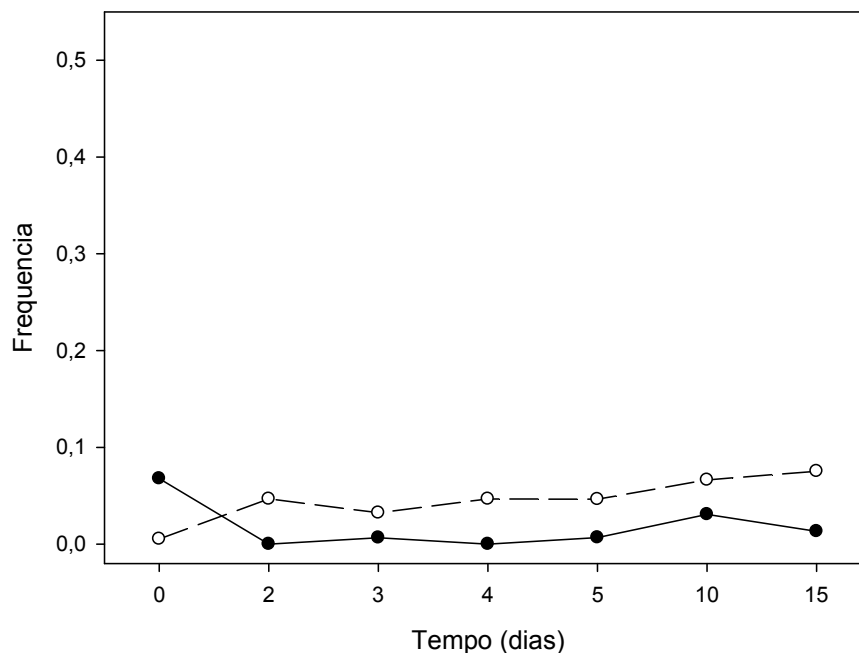


Fig. 23: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*: Formas intermediárias entre esferomastigotas e epimastigotas. O intestino e o reto de ninfas de 5º estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas evolutivas de *T. cruzi* foram contadas. ●: intestino, ○: reto.

Não foi observada a presença das formas intermediárias entre esferomastigotas e epimastigotas (Fig. 23) e entre esferomastigotas e tripomastigotas (Fig. 25) em grande quantidade, tanto no intestino quanto no reto. Na figura 24 é mostrada uma grande diferença entre o número de epimastigotas presentes no intestino e no reto. Como já era esperado, o número de formas epimastigotas se encontra bastante elevado no intestino. Com exceção de uma queda no 3º dia após a alimentação, o número de epimastigotas tende a aumentar no decorrer dos dias analisados. Em contraste, o número de formas epimastigotas presentes no reto se mantém baixo, em todos os dias acompanhados.



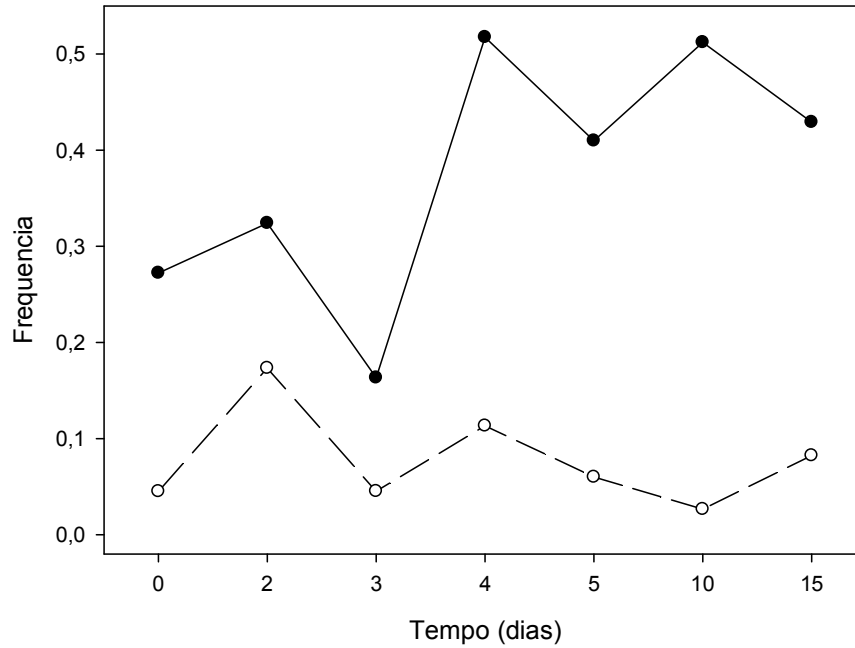


Fig. 24: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*: Epimastigotas. O intestino e o reto de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram contadas. ●: intestino, ○: reto.

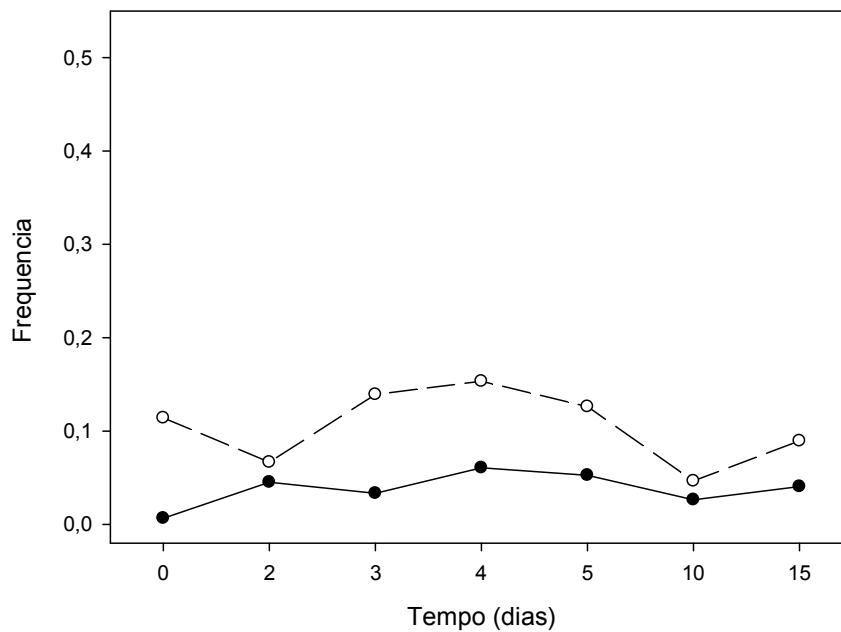


Fig. 25: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*: Formas intermediárias entre esferomastigotas e tripomastigotas. O intestino e o reto de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas evolutivas de *T. cruzi* foram contadas. ●: intestino, ○: reto.

As formas intermediárias entre epimastigota e tripomastigota estavam presentes em maior quantidade do que as outras formas intermediárias. Houve um aumento dessas formas no reto logo após a alimentação, em seguida foi observada uma queda até o 10<sup>o</sup> dia, e no 15<sup>o</sup> dia houve novamente um aumento, porém menor (Fig. 26). Já no intestino, o número dessas formas foi maior que o observado no reto. Nos insetos em jejum, o número se encontrou elevado, porém diminuiu nos primeiros dias após a alimentação, apresentando picos elevados no 5<sup>o</sup> e no 15<sup>o</sup> dia após a alimentação.

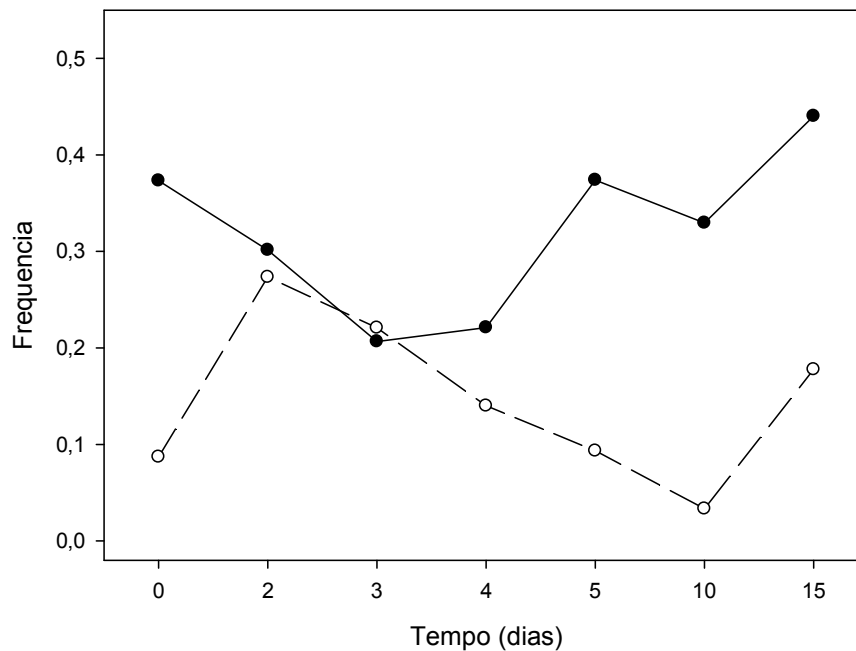


Fig. 26: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*: Formas intermediárias entre epimastigotas e tripomastigotas. O intestino e o reto de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas evolutivas de *T. cruzi* foram contadas. ●: intestino, ○: reto.

O número de formas tripomastigotas encontradas no intestino dos insetos foi muito pequeno (Fig. 27), entretanto, esse número foi bem elevado no reto. As formas tripomastigotas aparecem em quantidade crescente até o 5<sup>o</sup> dia, mas no 10<sup>o</sup> dia após a alimentação sofre uma brusca queda, encontrando-se em número um pouco mais elevado no 15<sup>o</sup> dia.

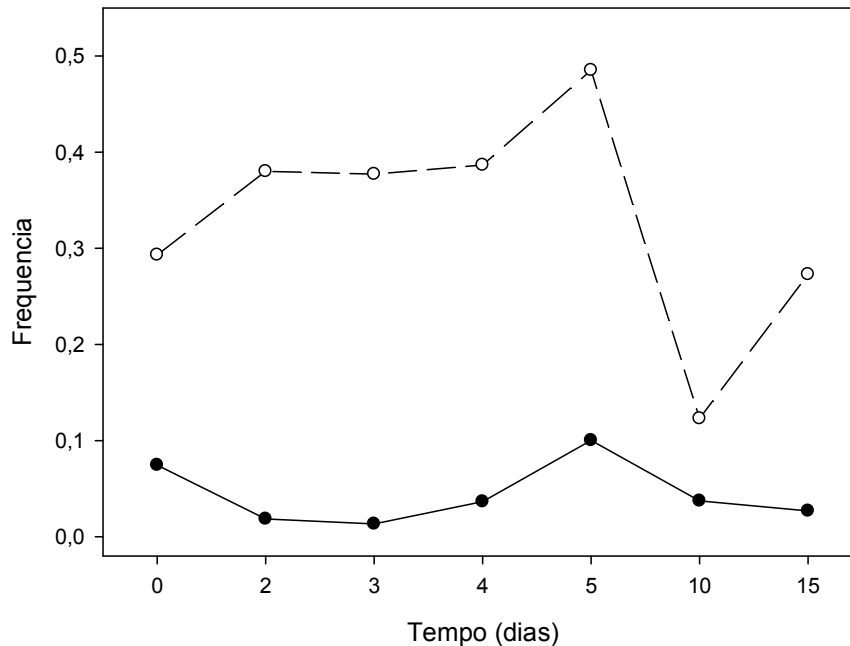


Fig. 27: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*: Tripomastigotas. O intestino e o reto de ninfas de 5<sup>o</sup> estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas evolutivas de *T. cruzi* foram contadas. ●: intestino, ○: reto.

Os resultados da contagem nos diferentes dias após a alimentação demonstrados nas figuras 21 a 27 foram somados e estão representados na figura 28. Esses dados mostram que as principais formas encontradas no intestino, quando todos os dias são levados em conta, são as formas epimastigotas e as intermediárias entre epimastigotas e tripomastigotas, e em menor quantidade as formas esferomastigotas. Já no reto, a forma tripomastigota foi encontrada em maior abundância, seguida das formas esferomastigotas e dos intermediários entre epimastigota e tripomastigota, encontrados em menor quantidade.

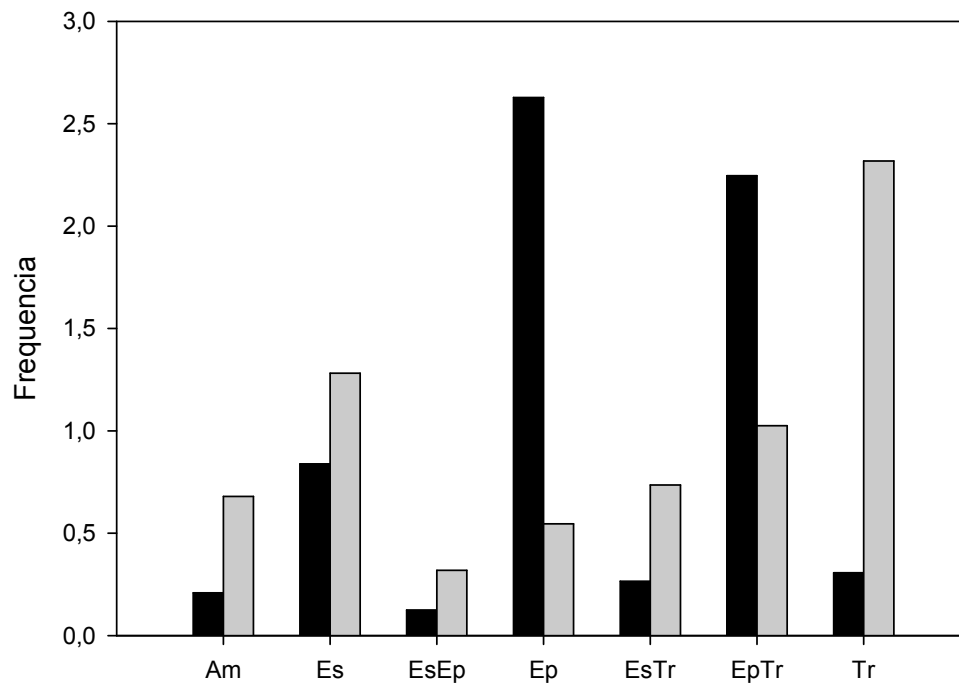


Fig. 28: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*. O intestino e o reto de ninfas de 5º estágio foram dissecados em diferentes dias após a alimentação e as formas evolutivas de *T. cruzi* foram contadas. Barras em preto: intestino, em cinza: reto. Am: amastigota, Es: esferomastigota, EsEp: intermediário entre esfero- e epimastigota, Ep: epimastigota, EsTr: intermediário entre esfero- e tripomastigota, EpTr: intermediário entre epi- e tripomastigota e Tr: tripomastigota

### 5. Efeito do PAF na interação de *Trypanosoma cruzi* (clone Dm 28c) com *Rhodnius prolixus*:

A incubação de *T. cruzi* com PAF 10  $\mu$ M por 1 hora levou a um aumento de mais de 3 vezes no número de parasitos aderidos por intestino (Fig. 29). Não houve mudança significativa quando os parasitos foram tratados com WEB 2086. Quando os parasitos são tratados com WEB 10  $\mu$ M, e em seguida com PAF, na mesma concentração (por 1 hora cada incubação), observamos um pequeno aumento no número de parasitos encontrados quando comparados ao controle e ao tratamento somente com WEB. Porém, quando comparamos com o tratamento somente com PAF, observa-se uma redução drástica no número de parasitos encontrados por intestino, mostrando que, neste caso, o WEB foi

capaz de bloquear o aumento no número de parasitos provocado pelo tratamento com PAF.

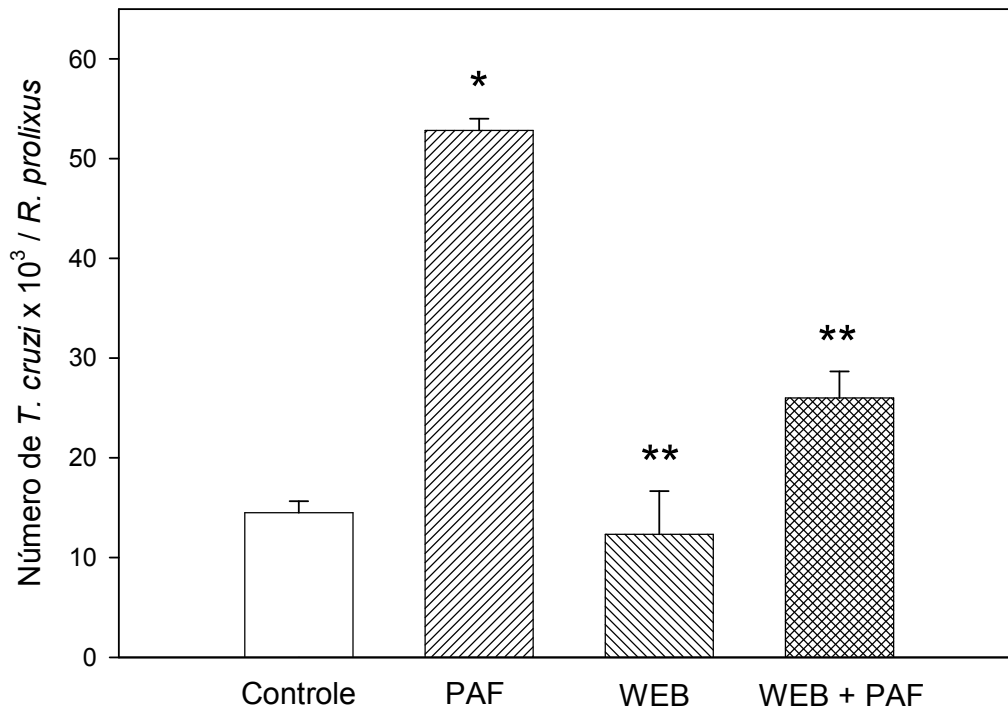


Fig. 29: Interação de *T. cruzi* com *R. prolixus* "ex vivo". O intestino e o reto foram incubados com  $2 \times 10^6$  epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram pré-tratados ou não com PAF, WEB ou ambos ( $10 \mu\text{M}$ ) por 1 hora. Média de 6 experimentos feitos com pelo menos 5 insetos por ponto, por experimento. \* indica diferença significativa em relação ao controle, e \*\* em relação ao PAF.

A figura 30 mostra que os insetos alimentados com *T. cruzi* previamente tratado com PAF  $10 \mu\text{M}$  apresentaram um nível de infecção maior que o grupo de insetos controle. O PAF provocou um aumento de cerca de 4 vezes no número de parasitos encontrados no aparelho digestivo dos insetos. O WEB 2086, antagonista que se liga ao mesmo receptor, não induziu alteração significativa no número de parasitos, quando comparado com o controle. Quando os parasitos foram incubados com WEB 2086  $10 \mu\text{M}$  antes da incubação com PAF  $10 \mu\text{M}$ , o número de parasitos por barbeiro foi cerca de 70% menor do que o encontrado quando os parasitos foram incubados somente com PAF, mostrando que o WEB 2086 foi capaz de bloquear o aumento provocado pela ação do PAF.

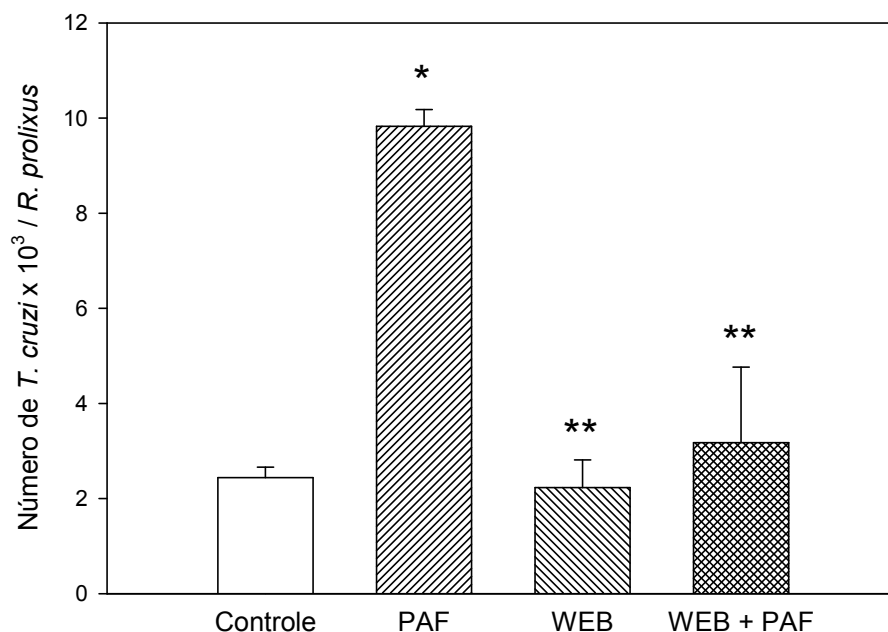


Fig. 30: Interação de *T. cruzi* com *R. prolixus* "in vivo". Os insetos foram alimentados com sangue adicionado de  $2 \times 10^8$  epimastigotas de *T. cruzi*/ml. Os parasitos foram pré-tratados ou não com PAF, WEB ou ambos ( $10 \mu\text{M}$ ) por 1 hora. Média de 6 experimentos feitos com pelo menos 5 insetos por ponto, por experimento. \* indica diferença significativa em relação ao controle, e \*\* em relação ao PAF.

## 6. Efeito do PAF na carga de superfície de *Trypanosoma cruzi*:

Para analisar quais efeitos provocados pelo PAF nos parasitos poderiam estar envolvidos no aumento da infecção dos insetos, a carga de superfície dos parasitos foi medida. A carga de superfície dos parasitos tratados com PAF  $10 \mu\text{M}$  foi 33% mais negativa que a dos parasitos controle (Fig. 31). Uma das hipóteses para uma carga de superfície mais negativa é um aumento da quantidade de ácido siálico. O tratamento com neuraminidase, uma enzima que cliva o ácido siálico, provocou uma redução de quase 40% na negatividade da superfície dos parasitos.

Parasitos tratados previamente com PAF foram incubados com neuraminidase. Nesse caso, o aumento da negatividade provocado pelo PAF foi totalmente abolido pelo tratamento com neuraminidase. Este achado sugere

que a modulação da carga de superfície provocada pelo PAF pode estar envolvida com o conteúdo de ácido siálico presente nas células.

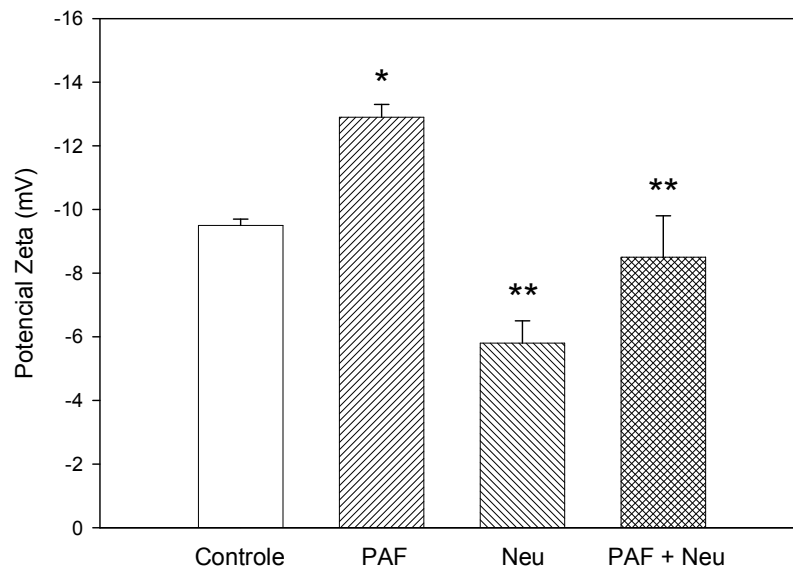


Fig. 31: Efeito do PAF e da neuraminidase (Neu) na carga de superfície de *T. cruzi*. Os parasitos foram pré-tratados ou não com PAF 10  $\mu$ M por 1 hora e/ou neuraminidase 0,2 U/ml por 2 horas. As células foram fixadas e a mobilidade eletroforética foi medida e convertida em potencial zeta. Média de 3 experimentos feitos em triplicata. \* indica diferença significativa em relação ao controle, e \*\* em relação ao PAF.

### **7. Ação da neuraminidase na interação de *Trypanosoma cruzi* com *Rhodnius prolixus*:**

Para verificar se o aumento da carga de superfície provocado pelo tratamento com PAF poderia estar relacionado com o aumento do número de parasitos encontrados no aparelho digestivo dos insetos, foram utilizados os mesmo sistemas de incubação dos parasitos com PAF e neuraminidase, para a interação com o inseto vetor. O tratamento dos parasitos com neuraminidase provocou uma redução do número de células de *T. cruzi* aderidas no intestino e reto de *R. prolixus* (Fig. 32), quando comparado ao controle. Quando os parasitos foram tratados com PAF, e em seguida com neuraminidase, uma drástica redução foi observada no número de parasitos encontrados nos insetos. Esses resultados sugerem que a presença de ácido siálico na

superfície dos parasitos é essencial para que ocorra a ligação ao aparelho digestivo do inseto vetor.

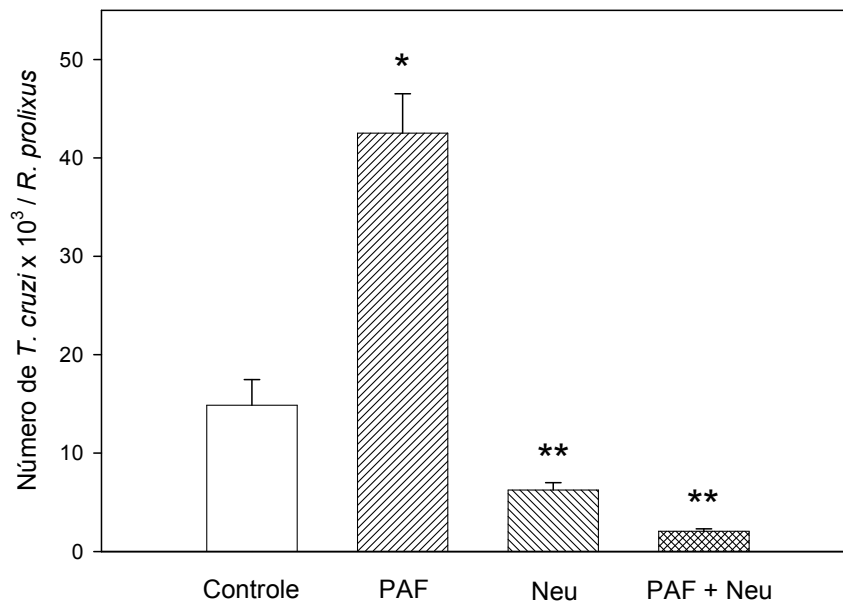


Fig. 32: Efeito da neuraminidase na interação de *T. cruzi* com *R. prolixus* "ex vivo". O intestino e o reto foram incubados com  $2 \times 10^6$  epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram pré-tratados ou não com PAF  $10 \mu\text{M}$  por 1 hora e/ou neuraminidase  $0,2 \text{ U/ml}$  por 2 horas. Média de 6 experimentos feitos com pelo menos 5 insetos por ponto, por experimento. \* indica diferença significativa em relação ao controle, e \*\* em relação ao PAF.

## 8. Modulação da quantidade de ácido siálico de *Trypanosoma cruzi* pelo PAF:

Para confirmar a participação do ácido siálico na superfície dos parasitos como um dos responsáveis pelos efeitos provocados pelo tratamento com PAF, a quantidade de ácido siálico foi medida, após duas extrações por hidrólise ácida.

A quantidade de ácido siálico encontrada quando os parasitos foram tratados com PAF foi mais que 3 vezes superior à quantidade encontrada nos parasitos controle (Fig. 33). De alguma forma o PAF foi capaz de promover uma alteração não somente na carga de superfície, como também na quantidade de ácido siálico presente nos parasitos.



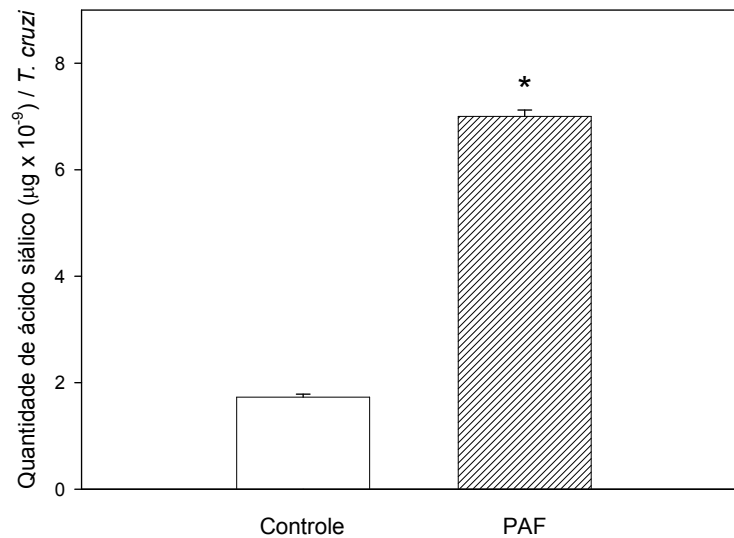


Fig. 33: Efeito do PAF sobre a quantidade de ácido siálico de *T. cruzi*. Os parasitos, pré-tratados ou não com PAF 10 µM por 1 hora, foram submetidos a 2 hidrólises ácidas, e a quantidade de ácido siálico no sobrenadante das hidrólises foi medido colorimetricamente. Média de 2 experimentos, foram feitas 3 medidas por ponto. \* indica diferença significativa em relação ao controle.

### 9. Efeito do PAF e de diferentes moduladores de sinalização intracelular na interação de *Leishmania chagasi* com cultura de células de *Lutzomyia longipalpis* “in vitro”:

O tratamento de promastigotas de *L. chagasi* com PAF 10 µM levou a um aumento de quase 100% no índice de associação (Fig. 34). Esse índice demonstra a infectividade dos parasitos para as células LL-5, levando em conta não somente um maior número de células infectadas, como também um maior número de parasitos associados às células infectadas. O tratamento prévio das células LL-5 com PAF 10 µM não mostrou diferença significativa no índice de associação dos parasitos em relação ao controle, o mesmo ocorrendo quando tanto as células LL-5 quanto os parasitos foram tratados com PAF antes da interação.

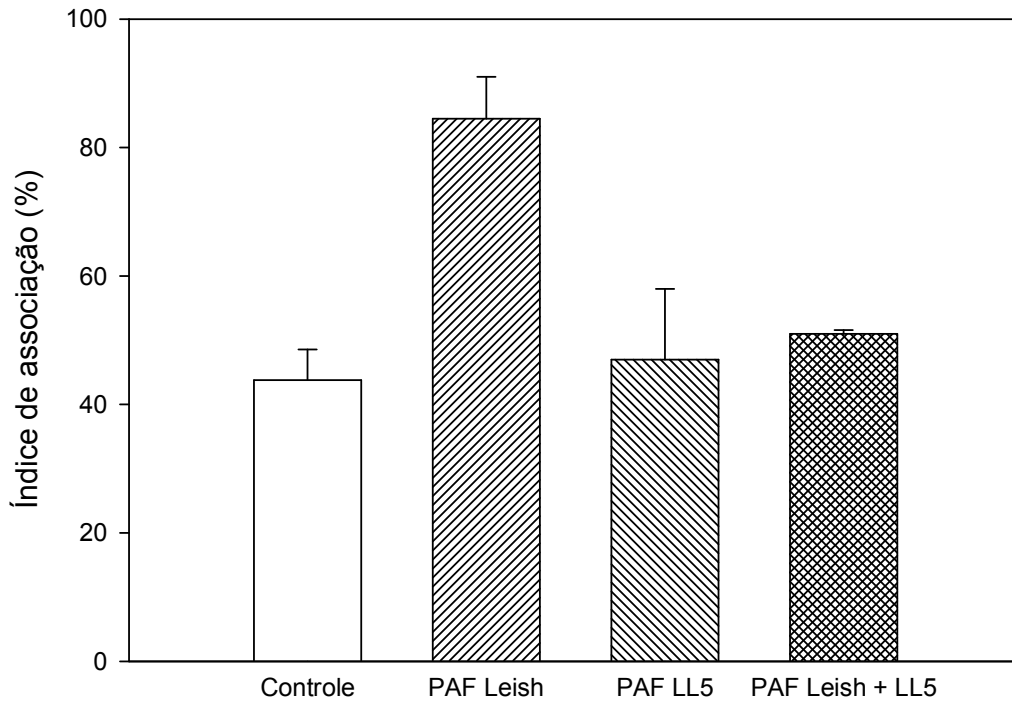


Fig. 34: Interação de promastigotas de *L. chagasi* (Leish) com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. As promastigotas e as células LL-5 foram tratadas ou não com PAF 10  $\mu$ M por 1 hora antes da interação. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

O tratamento das promastigotas com WEB 2086, antes do tratamento com PAF, foi capaz de bloquear o aumento do índice de associação provocado pelo PAF (Fig. 35). Esse resultado reforça a hipótese de que o efeito provocado pelo PAF ocorre via ligação ao seu receptor específico, uma vez que o antagonista WEB é capaz de impedir a ação do PAF.

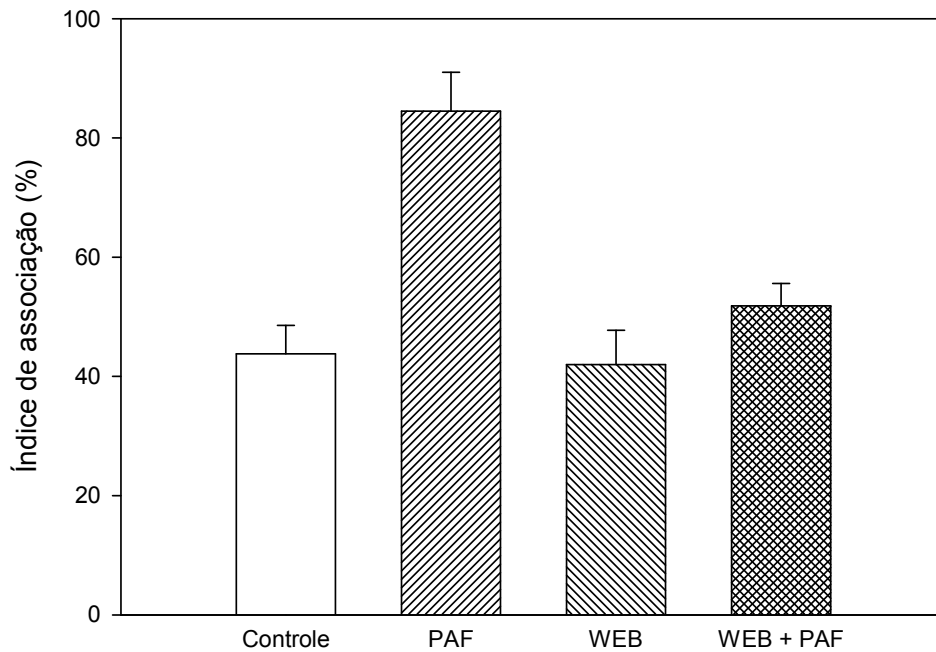


Fig. 35: Interação de promastigotas de *L. chagasi* com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. As promastigotas foram tratadas ou não com PAF e WEB 2086 10  $\mu$ M por 1 hora antes da interação. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

O tratamento de promastigotas de *L. chagasi* com BIS, que é um inibidor de PKC, leva a uma pequena redução do índice de associação em relação ao controle (Fig. 36). No entanto, o tratamento com BIS 20 nM por 1 hora, seguido de tratamento com PAF por mais 1 hora, resulta em uma drástica queda do índice de associação que havia sido estimulado somente por PAF.

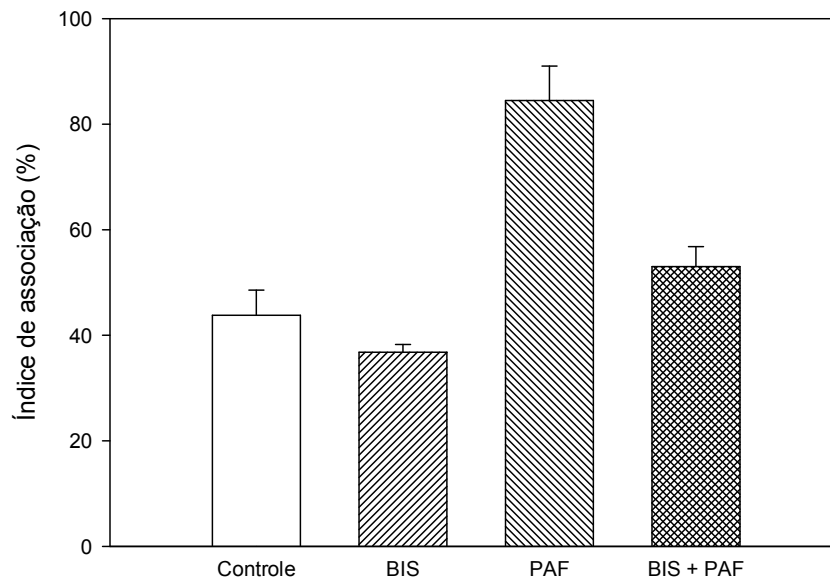


Fig. 36: Interação de promastigotas de *L. chagasi* com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. As promastigotas foram tratadas ou não com BIS 20 nM e PAF 10  $\mu$ M por 1 hora antes da interação. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

Quando somente as células LL-5 são tratadas com BIS, nenhum efeito significativo é observado (Fig. 37a). O mesmo acontece quando estas células são tratadas com BIS e com PAF.

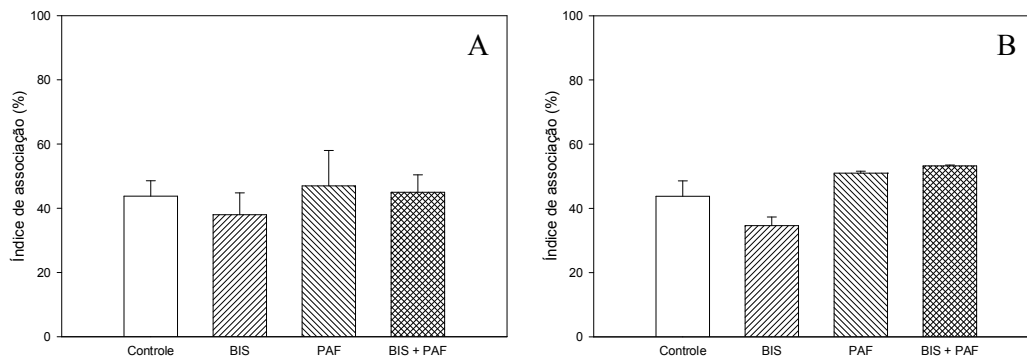


Fig. 37: Interação de promastigotas de *L. chagasi* com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. Em (A), as células LL-5 foram tratadas com BIS 20 nM e PAF 10  $\mu$ M por 1 hora antes da interação, e em (B) ambas as células LL-5 e promastigotas foram tratadas. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

Na figura 37b, tanto as células LL-5 quanto os parasitos foram tratados antes da incubação. O índice de associação das células tratadas com BIS foi cerca de 20% menor que as células controle. Porém, não houve diferença significativa quando as células foram tratadas com BIS antes do tratamento com PAF.

O tratamento somente com o inibidor de CK2 (TBB) não parece interferir na associação dos parasitos às células LL-5, quando somente as promastigotas de *L. chagasi* são tratadas (Fig. 38), ou quando somente as células LL-5 são tratadas (Fig. 39a). Entretanto, o tratamento com TBB antes do tratamento com PAF leva a uma redução no índice de associação, quando comparado ao tratamento somente com PAF; quando somente os parasitos são tratados, ocorre uma redução de 21% (Fig. 38), e quando somente as células LL-5 são tratadas, a redução é de 26% (Fig. 39a).

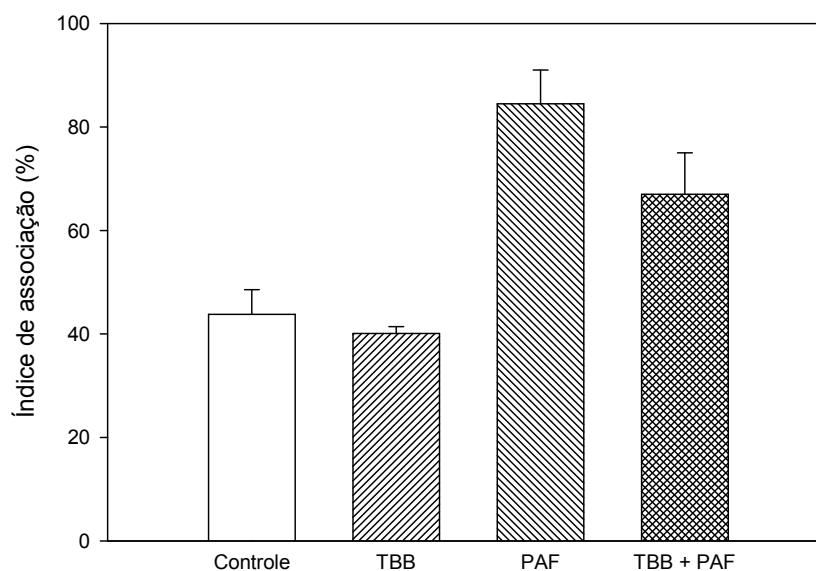


Fig. 38: Interação de promastigotas de *L. chagasi* com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. Somente as formas promastigotas foram tratadas com TBB 20 nM e PAF 10  $\mu$ M por 1 hora antes da interação. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

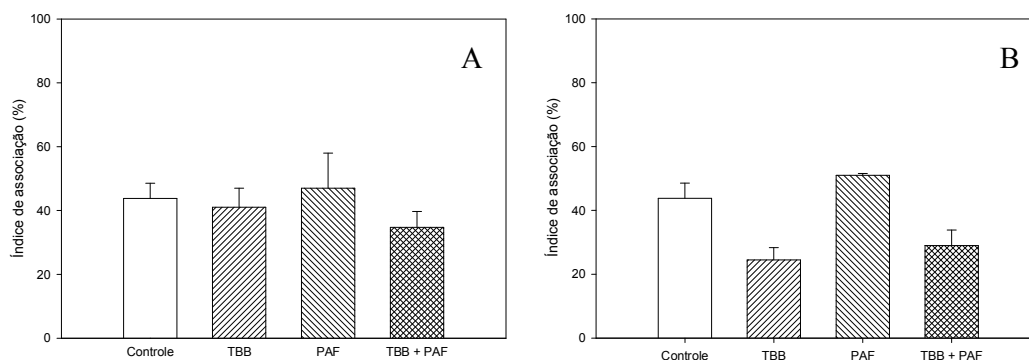


Fig. 39: Interação de promastigotas de *L. chagasi* com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. Em (A), as células LL-5 foram tratadas com TBB 20 nM e PAF 10 μM por 1 hora antes da interação, e em (B) ambas as células LL-5 e promastigotas foram tratadas. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

Quando as células LL-5 e as promastigotas são tratadas com TBB (Fig. 39b), há uma diminuição de mais de 43% no índice de associação. Isto ocorre tanto quando ambas as células são tratadas somente com TBB, como quando as mesmas são tratadas com TBB seguido de tratamento com PAF.

O tratamento dos parasitos com toxina pertussis, que é uma toxina capaz de bloquear a ação da proteína G inibitória, provocou uma leve redução nos índices de associação (Fig. 40). Nos parasitos tratados somente com a toxina pertussis, a redução foi de 27% em relação ao controle. Já o grupo de parasitos tratados com toxina pertussis e depois com PAF apresentou uma redução um pouco menor, 16%, quando comparado com o grupo de parasitos tratados somente com PAF.

A toxina pertussis não foi capaz de provocar uma alteração significativa no índice de associação quando somente as células LL-5 foram tratadas (Fig. 41a), assim como não pôde ser observada ação da toxina pertussis quando ambas as células foram tratadas (Fig. 41b).

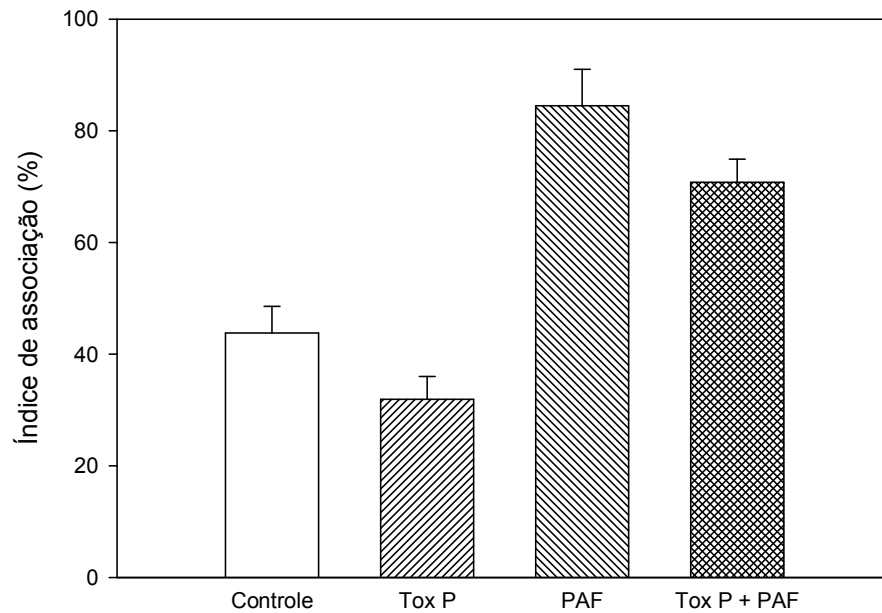


Fig. 40: Interação de promastigotas de *L. chagasi* com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. Somente as formas promastigotas foram tratadas com toxina pertussis (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e PAF 10  $\mu\text{M}$  por 1 hora antes da interação. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

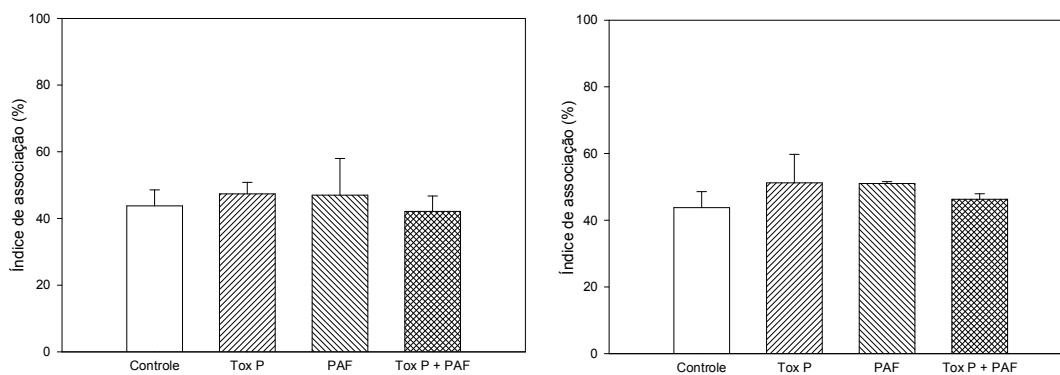


Fig. 41: Interação de promastigotas de *L. chagasi* com células LL-5 de *Lu. longipalpis*. Em (A), as células LL-5 foram tratadas com toxina pertussis (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e PAF 10  $\mu\text{M}$  por 1 hora antes da interação, e em (B) ambas as células LL-5 e promastigotas foram tratadas. Foram realizados 3 experimentos, feitos em triplicata.

## V. DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas no mundo e a Organização Mundial da Saúde aponta, como uma das principais causas do insucesso global no combate às essas doenças, o desconhecimento da biologia dos vetores e parasitos, que limita o desenvolvimento de novas estratégias de controle (HOTEZ *et al.*, 2007). No caso da doença de Chagas, apesar de diversos estudos terem sido realizados em relação à interação parasito-hospedeiro invertebrado, ainda há muitos aspectos a serem elucidados nessa área.

Em 1991 os governos da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Peru se uniram através da Iniciativa no Cone Sul para eliminar o principal vetor da doença de Chagas, o *T. infestans* (MONCAYO, 2003). Além da eliminação do *T. infestans*, outro objetivo dessa iniciativa era diminuir o risco de transmissão da doença por transfusão sanguínea (SCHOFIELD & DIAS, 1999). Os esforços dessa iniciativa foram reconhecidos em 2006, quando a Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO) concedeu ao Brasil a Certificação Internacional de Eliminação da Doença de Chagas pelo *T. infestans* (MASSAD, 2008). Entretanto, essa certificação não representa o controle efetivo da doença no Brasil, e sim apenas a interrupção momentânea da transmissão, especificamente pela espécie *T. infestans*. É importante ressaltar que o problema do controle da doença de Chagas ainda não está resolvido, e os avanços alcançados recentemente podem levar a uma perda da vontade política e da participação popular nas estratégias de combate, o que seria essencial não somente para a continuidade do combate a transmissão, como também para a manutenção dos avanços alcançados até o momento (FERREIRA & SILVA, 2006).

Dentre as doenças transmitidas por artrópodes, uma das principais estratégias de controle é o combate aos vetores. Frente às mudanças climáticas, a relação entre o desenvolvimento de insetos vetores e a temperatura tem sido pouco estudada. Sabe-se que a taxa de desenvolvimento de populações de insetos depende diretamente de características relacionadas ao crescimento dos estágios imaturos, onde o principal fator regulador é a temperatura (BAYOH & LINDSAY, 2003). No caso da doença de Chagas, as



possíveis alterações poderiam ser provocadas pelos efeitos do aquecimento global: modificação da distribuição geográfica das espécies, alterações no mecanismo de dispersão pelo vôo, aumento no número de repastos (levando a uma maior probabilidade de infecção e transmissão), aceleração do ciclo biológico e aumento da densidade populacional (ROCHA *et al.*, 2001).

Nós constatamos que fêmeas de *R. prolixus* são capazes de por ovos entre as temperaturas de 18 e 38°C, sendo que a postura é maior entre as temperaturas de 22 e 34°C. A maior taxa de eclosão foi encontrada entre os ovos que foram postos entre as temperaturas de 22 e 30°C, sendo que nenhum dos ovos postos a 38°C eclodiu (Fig. 12).

O perfil de postura dos ovos ao longo dos dias difere de acordo com as temperaturas (Fig. 11). Nas temperaturas mais baixas, a postura de ovos, que é baixa, ocorre mais tardiamente. Entre 22 e 30°C, os perfis são semelhantes, com um alto número de ovos postos. A partir da temperatura de 34°C a postura dos ovos se desloca, se concentrando entre os primeiros 10 dias após a alimentação, sendo que muito poucos ovos são colocados após o 20º dia.

É interessante observar que os ovos que demoraram mais tempo para eclodir quando deixados à temperatura ambiente (entre 17 e 19 dias, com mediana de 18 dias) foram postos nas temperaturas mais baixas, de 18 e 20°C. E os ovos que demoraram menos tempo para eclodir (entre 11 e 14 dias, com medianas de 12 e 14 dias) foram os postos nas temperaturas mais elevadas, 34 e 36°C, respectivamente (Tabela 2). Entretanto, o dia após a alimentação em que um maior número de ovos eclodiu foi o 16º dia (Fig. 14).

Quando ovos de fêmeas controle foram colocados para eclodir em diferentes temperaturas, observamos um perfil de eclosão diferente. As temperaturas ótimas para eclosão ficaram entre 24 e 34°C (Fig. 15). Um dado interessante foi que na temperatura de 22°C, onde as fêmeas colocaram um maior número de ovos, nenhum dos ovos foi capaz de eclodir. A única temperatura em que todos os ovos eclodiram foi de 26°C. Também foi observado que os ovos nas temperaturas mais baixas demoraram mais tempo para eclodir do que em temperaturas mais elevadas; a mediana foi de 15 dias na temperatura de 26°C, enquanto que na temperatura de 34°C a mediana foi de 11 dias, por exemplo (Tabela 3). Na figura 17 notamos que a maioria dos ovos eclodiu no 11º dia após a alimentação, seguido do 12º e do 13º dia.

Okasha demonstrou em uma série de trabalhos os efeitos de altas temperaturas em *R. prolixus*. Ele mostrou que altas temperaturas sub-letais prejudicam a síntese de proteínas e causam a interrupção da ecdise, da divisão celular e da secreção do hormônio cerebral (OKASHA, 1968a, 1968b e 1968c). Também foi mostrado que a temperatura e a umidade relativa podem afetar a viabilidade dos ovos (CLARK, 1935). Schilman & Lazzari (2004) fizeram um interessante estudo sobre a escolha espontânea de temperatura por *R. prolixus*, focando a análise na modulação da preferência térmica em função dos níveis de fome, e relacionando o efeito da temperatura no estado nutricional e na perda de água nesses insetos.

Os estudos de bactérias simbiotes em triatomíneos são bem antigos. O primeiro registro foi feito por Dias, em 1934, quando foram observados em cortes histológicos de células epiteliais da região anterior do estômago de *Triatoma megista* (*Pantronsgylus megistus*) elementos esféricos e baciliformes, semelhantes aos observados na luz do estômago e aderidos na sua superfície interna. Também foram observados simbiotes intra- e extracelulares em *R. prolixus*, e foi sugerida sua participação na aquisição de vitamina B por esses insetos (WIGGLESWORTH, 1936). Foi sugerido recentemente que as bactérias simbiotes podem fornecer proteção aos insetos contra parasitos e predadores (BROWNLIE & JOHNSON, 2009). De fato, essa idéia foi demonstrada usando como modelo *Drosophila melanogaster*. Foi observado que a presença da bactéria simbiote do gênero *Wolbachia* foi capaz de conferir proteção contra infecção por patógenos virais (HEDGES *et al*, 2008; TEIXEIRA, FERREIRA & ASHBURNER, 2008).

Nos últimos anos tem sido demonstrada uma nova abordagem para o controle das doenças transmitidas por artrópodes, a paratransgênese. Essa metodologia se baseia na modificação genética de bactérias simbiotes presentes nos insetos, fazendo com que elas expressem um produto que impeça a transmissão de algum patógeno por esses insetos (BEARD, DURVASULA & RICHARDS, 1998; BEARD, CORDON-ROSALES & DURVASULA, 2002). Já foi expresso com sucesso um peptídeo antimicrobiano no simbiote de *R. prolixus*. O peptídeo formador de poros Cecropina A, expresso em *Rhodococcus rhodnii*, foi capaz de eliminar o *T. cruzi* de 65% dos insetos colonizados com os simbiotes geneticamente modificados, e nos

outros 35% dos insetos o número de parasitos encontrados foi drasticamente reduzido (DURVASULA *et al.*, 1997). Também já foi expresso em simbioses de *R. prolixus* e *T. infestans* um fragmento funcional de anticorpo de mamífero, porém o alvo desse anticorpo não está relacionado com a infecção por *T. cruzi* (DURVASULA *et al.*, 1999; 2008). Um dos problemas dessa abordagem é a estabilidade e a eficiência da transformação dos simbioses. Para contornar esses problemas tem se usado, ao invés de plasmídeos que se multipliquem no citoplasma, plasmídeos que se integrem no genoma bacteriano (DOTSON *et al.*, 2003). A paratransgênese é uma abordagem bastante promissora, e a busca de novos produtos a serem expressos por bactérias simbioses é um atraente alvo de estudo (FIECK *et al.*, 2010).

Diante da extrema importância da população de bactérias simbioses para os triatomíneos, e do seu possível envolvimento na infecção com *T. cruzi*, decidimos estudar a população de simbioses de *T. infestans*. Sabe-se que nesses insetos os simbioses se concentram na porção anterior do aparelho digestivo, mas ainda não foram realizados estudos para elucidar a razão pela qual isso ocorre (EISCHLER & SCHAUB, 2002). Em experimentos preliminares mostramos que a presença do conteúdo do intestino de *T. infestans* foi capaz de inibir o crescimento de bactérias presentes no estômago. Como a atividade de enzimas digestivas é intensa no intestino, utilizamos a pepstatina, um inibidor de catepsina D, para testar se essa enzima estaria envolvida nessa redução do crescimento provocada pelo conteúdo do estômago. E de fato a presença da pepstatina bloqueou a redução no crescimento provocada pelo conteúdo intestinal, sugerindo que um dos possíveis mecanismos pelo qual a população de simbioses se encontra reduzida no intestino seria a atividade da catepsina D (Fig. 18). Entretanto, ainda são necessários mais estudos para caracterizar o efeito da atividade enzimática intestinal sobre a população de simbioses em *T. infestans*, e analisar se há uma co-relação desses fatores com a infecção por *T. cruzi*, como já foi sugerido por alguns autores (EISCHLER & SCHAUB, 2002; BORGES *et al.*, 2006).

Quando observamos a infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*, notamos que o número de parasitos cai no 5<sup>o</sup> dia após a alimentação, depois o número de parasitos volta a subir no 10<sup>o</sup> dia (Fig. 19). Se olharmos somente para a figura 28, pressupomos que as formas predominantes encontradas são a

formas epimastigotas, tripomastigotas, e as formas intermediárias entre essas duas. Entretanto, quando correlacionamos a análise quantitativa (Fig. 19) com as análises qualitativas (Fig. 21-27), vimos um quadro bem diferente (Fig. 42 e 43).

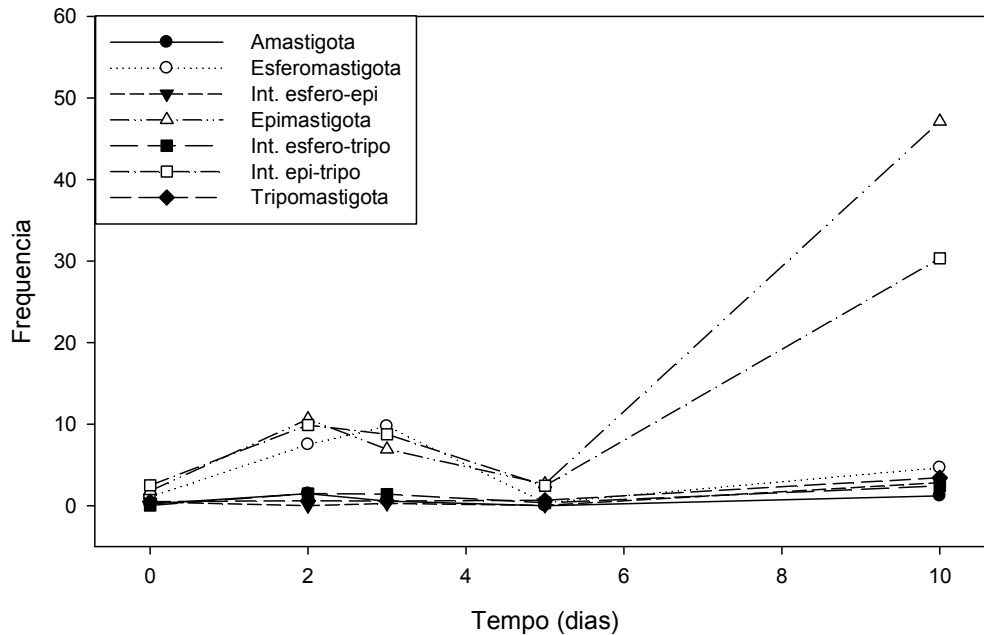


Fig. 42: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*. Intestino. Relação entre a contagem das diferentes formas evolutivas em esfregaços corados, e a contagem do número de parasitos em câmara de Neubauer.

A figura 42 mostra que as formas predominantes de *T. cruzi* no intestino de *T. infestans* entre o 2º e o 3º dia após a alimentação são esferomastigotas, epimastigotas e intermediários entre epimastigotas e tripomastigotas, porém o número de parasitos ainda é pequeno. No 10º dia, há um número muito maior de parasitos presentes, sendo que as formas predominantes são epimastigotas e os intermediários entre epimastigotas e tripomastigotas, não sendo mais encontradas as formas esferomastigotas em quantidade significativa.

No reto, o resultado encontrado foi diferente. A forma predominante encontrada até o 5º dia após a alimentação foi a forma tripomastigota (Fig. 43). Entretanto, essas formas não sofreram um grande aumento na quantidade no 10º dia, enquanto que as formas esferomastigotas, que no 5º dia estavam presentes em pequenas quantidades, foram encontradas em número bastante

elevado no 10<sup>o</sup> dia, seguida das formas amastigotas. No entanto, não foi possível realizar a contagem do número de parasitos no 15<sup>o</sup> dia nas lâminas a fresco (Fig. 19), data essa em que a proporção de formas tripomastigotas apresentou um aumento quando observadas as lâminas coradas (Fig. 27). Vale lembrar que nesse experimento as ninfas de 5<sup>o</sup> estágio utilizadas haviam sido infectadas no 1<sup>o</sup> estágio. Sendo assim, nos insetos em jejum, praticamente não havia parasitos na região anterior do aparelho digestivo, pois os parasitos se encontravam confinados no reto. Após a alimentação pode-se observar um aumento do número de parasitos no intestino, devido à intensa multiplicação das poucas formas lá existentes, e/ou devido a uma migração dos parasitos presentes no reto.

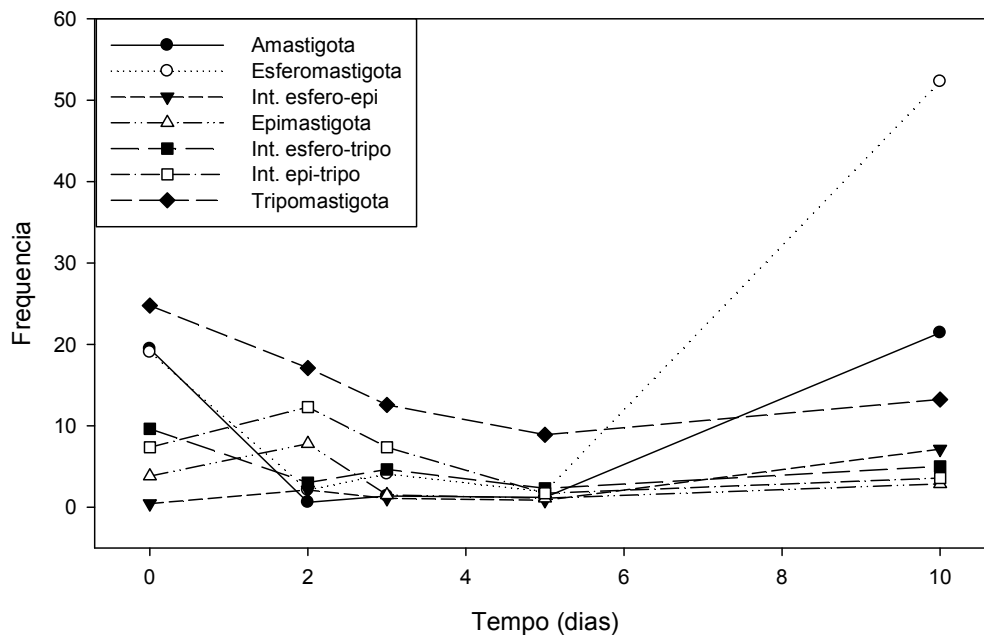


Fig. 43: Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*. Reto. Relação entre a contagem das diferentes formas evolutivas em esfregaços corados, e a contagem do número de parasitos em câmara de Neubauer.

Desde a sua descoberta há cerca de 30 anos atrás, o PAF, um dos mediadores lipídicos mais importantes, tem sido encontrado amplamente distribuído em invertebrados (SIGIURA *et al.*, 1992; KULIKOV & MUZYA, 1997; ISHII & SHIMIZU, 2000), sendo pouco estudado em insetos. Entretanto, homólogos das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da PAF-acetilhidrolase de mamíferos foram

reportados no genoma de *D. melanogaster*, sendo que a subunidade  $\beta$  foi identificada como altamente conservada desde *Drosophila* até mamíferos (SHEFFIELD *et al.*, 2000). Uma fosfolipase C, específica para PAF, nomeada de PAF fosforilcolina hidrolase, foi descrita nas glândulas salivares e na saliva do mosquito *Culex quinquefasciatus* (RIBEIRO & FRANCISCHETTI, 2001). Interessantemente, o WEB 2086 é capaz de inibir a reação de microagregação de hemócitos promovida por *Trypanosoma rangeli* em *R. prolixus* (MACHADO, AZAMBUJA & GARCIA, 2006). Além disso, recentemente demonstramos que *T. cruzi* sintetiza um fosfolipídio com atividade semelhante ao PAF (Tc-PAF), que é capaz de estimular a diferenciação celular do próprio parasito, de formas epimastigotas para tripomastigotas, “in vitro”, transformação esta que na natureza ocorre no intestino do barbeiro. Além disso, quando epimastigotas são pré-tratadas com o Tc-PAF, há um aumento no índice de associação entre esses parasitos e macrófagos peritoneais de camundongos (GOMES *et al.*, 2006). Todos os efeitos do PAF em tripanossomatídeos, assim como os do Tc-PAF, parecem ocorrer via receptor de superfície, já que foram revertidos pelo antagonista de receptor de PAF, WEB 2086.

Desta maneira, um dos objetivos de nosso trabalho foi o de estudar os efeitos do PAF e de seu antagonista, WEB 2086, na interação de *T. cruzi* com o tubo digestivo de *R. prolixus*. A interação de *T. cruzi* com *R. prolixus* foi analisada “ex vivo”, utilizando o intestino e o reto extraídos do inseto. O tratamento dos epimastigotas com PAF, antes da interação, levou a um aumento de mais de quatro vezes no número de parasitos aderidos por intestino. Novamente, o PAF mostrou ser capaz de modular positivamente a infecção do *T. cruzi*. Esta modulação da interação pelo PAF foi quase totalmente revertida quando os epimastigotas foram previamente tratados com seu antagonista, o WEB 2086, sugerindo ser este aumento provocado pela ligação do PAF ao seu receptor de membrana, nos parasitos (Fig. 29).

O tratamento das formas epimastigotas de *T. cruzi* com PAF 10  $\mu$ M, antes da alimentação dos triatomíneos, foi capaz de provocar um aumento de 4 vezes no número de protozoários encontrados no intestino de *R. prolixus*. Quando os parasitos foram pré-tratados com WEB 2086 10  $\mu$ M, antes da incubação com PAF 10  $\mu$ M, o número de parasitos encontrados foi um pouco maior que no controle, porém bem menor que comparado ao tratamento

somente com PAF (Fig. 30). Este conjunto de resultados demonstra que o WEB 2086 é capaz de reverter o efeito do PAF, sugerindo mais uma vez que esta ação provocada pelo PAF nesse sistema também ocorre via ligação ao seu receptor específico na superfície do *T. cruzi*.

A ligação dos epimastigotas ao epitélio do aparelho digestivo do triatomíneo é uma importante etapa para o sucesso do ciclo do *T. cruzi*, uma vez que impede a eliminação dos mesmos junto com o conteúdo intestinal do vetor. Este mecanismo não ocorre somente com *T. cruzi* e *R. prolixus* (SCHAUB *et al.*, 1998). O primeiro passo para sucesso da infecção do *T. brucei* no vetor (mosca tsé-tsé) é a ligação do parasito ao epitélio e membrana peritrófica, e a colonização do intestino (GIBSON & BAILEY, 2003). É sabido que o *T. rangeli* se liga preferencialmente a determinadas células epiteliais no intestino do *R. prolixus*, onde são capazes de penetrar no epitélio, atravessar a lâmina basal e chegar à hemolinfa, onde terão acesso às glândulas salivares (OLIVEIRA & DE SOUZA, 2001). Oocinetos de *Plasmodium* também são capazes de se ligar à membrana peritrófica e ao epitélio do intestino do vetor, penetrando até encontrarem a lâmina basal, onde se transformam em oocistos (ARRIGHI *et al.*, 2005).

Tendo em vista a importância da etapa de adesão dos epimastigotas ao aparelho digestivo do inseto vetor, decidimos tentar caracterizar o mecanismo pelo qual o PAF promove um aumento na infecção de *R. prolixus* por *T. cruzi*. É conhecido que um importante fator que influencia a aderência e a seletividade das células é sua carga elétrica negativa, exercendo papel fundamental na interação parasito-hospedeiro. A carga de superfície das células consiste na interação de grupamentos polares presentes na sua membrana com os íons encontrados no meio externo. Uma das maneiras de se medir essa carga é através da mobilidade eletroforética. Esta técnica mede a mobilidade das células sob ação de uma corrente elétrica de intensidade conhecida, em uma câmara de eletroforese celular. Desta forma, podemos calcular indiretamente o potencial zeta, que nada mais é do que o potencial resultante entre o potencial da superfície da célula e do meio em que ela se encontra (SOUTO-PADRON, 2002).

Ao medirmos o potencial zeta dos parasitos tratados com PAF, observamos um aumento de 35% em relação ao controle. Isso mostra que o

tratamento com PAF torna a carga de superfície do *T. cruzi* mais negativa (Fig. 31). Como o principal componente responsável pela carga de superfície de tripanossomatídeos são unidades de ácido siálico, realizamos a medição novamente da carga de superfície do *T. cruzi*, mas desta vez tratando as células com neuraminidase, uma enzima que cliva o ácido siálico, a fim de demonstrar se a diferença na carga de superfície está relacionada com a composição de ácido siálico da superfície dos parasitos. As células tratadas com neuraminidase apresentaram uma redução de cerca de 40% no potencial zeta, quando comparadas às células controle. Nas células tratadas com PAF e em seguida com neuraminidase, essa redução foi um pouco menor, em média 34%, quando comparada às células tratadas somente com PAF.

Para testar a hipótese de que o ácido siálico da superfície dos parasitos poderiam estar envolvidos na sua ligação ao aparelho digestivo do inseto vetor, foi novamente realizada a interação “ex vivo”, mas desta vez com os parasitos tratados também com neuraminidase (Fig. 32). Quando os parasitos são tratados com neuraminidase, são recuperados cerca de 60% menos parasitos quando comparados à interação no sistema controle. Porém, quando o tratamento é feito com PAF e depois com neuraminidase, o efeito é muito mais drástico, pois ocorre uma redução de 95% no número de células de *T. cruzi* encontradas.

Para confirmar o envolvimento do ácido siálico na superfície dos parasitos com os efeitos provocados pelo tratamento do *T. cruzi* com PAF, foi feita a quantificação colorimétrica do ácido siálico por espectrofotometria, baseada no método do ácido tiobarbitúrico (WARREN, 1959). Vimos, na figura 33, que o tratamento com PAF foi capaz de aumentar em cerca de 4 vezes a quantidade de ácido siálico nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. O conjunto desses resultados corrobora a hipótese de que o PAF modula a carga de superfície das formas epimastigotas de *T. cruzi* através da alteração na composição de ácido siálico na superfície das células, e essa alteração pode ser responsável pelo aumento na interação de *R. prolixus* com *T. cruzi* promovida pelo PAF.

Moléculas de ácido siálico foram descobertas em *T. cruzi* no início da década de 80 (PEREIRA *et al.*, 1980). Sabe-se que esses parasitos não são capazes de sintetizar ácido siálico, e utilizam uma enzima, a trans-sialidase, para retirar moléculas de ácido siálico do meio externo, colocando-os em



aceptores em sua superfície (SCHENKMAN *et al.*, 1994). Há duas possibilidades que explicariam o aumento do ácido siálico nos parasitos tratados com PAF. A primeira seria que o tratamento com o PAF faria com que as células incorporassem mais ácido siálico, ou que o ácido siálico ficaria mais exposto, e conseqüentemente mais ácido siálico seria extraído dos parasitos. A outra possibilidade seria que o PAF estaria de alguma forma impedindo a desialilação que estaria ocorrendo nas células controle, fazendo com que a quantidade de ácido siálico encontrada nas células controle seja menor que a encontrada nas células tratadas com PAF. Conseqüentemente, notamos a necessidade de estudos posteriores para testar essas e outras hipóteses que expliquem a ação do PAF.

O sequenciamento dos genomas de três tripanossomatídeos patogênicos para o homem, *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, foi recentemente completado, o que permitiu a análise do conjunto de proteínas cinases (“kinoma”) de cada parasito (PARSONS *et al.*, 2005). Tal análise revelou que cada espécie possui 179, 156 e 171 proteínas cinases de eucariotos, respectivamente, o que representa cerca de um terço do “kinoma” humano. A análise revelou que os tripanossomatídeos não possuem membros das famílias de tirosina cinases citossólicas ou ligadas a receptores. Entretanto, esses parasitos apresentam membros das famílias de proteínas cinases STE e CMGC em abundância, que parecem estar envolvidos com a regulação do ciclo celular, diferenciação celular e resposta a estresse, durante seus complexos ciclos de vida (PARSONS *et al.*, 2005; NAULA *et al.*, 2005).

Percebe-se, assim, que o estudo sobre as vias de sinalização intracelular de tripanossomatídeos, em especial no que diz respeito à participação das proteínas cinases, é de suma importância, porque as descobertas que se seguirem a esses estudos poderão levar ao desenvolvimento de novas drogas quimioterápicas contra esses parasitos. Resultados de nosso laboratório demonstram que o PAF é capaz de induzir um estímulo na diferenciação celular de *T. cruzi* e *H. m. muscarum* (RODRIGUES *et al.*, 1996; LOPES *et al.*, 1997), com envolvimento de transdução de sinais e participação das proteínas cinases PKC e CK2 (RODRIGUES *et al.*, 1999; SILVA-NETO *et al.*, 2002).

Em sua grande maioria, os estudos sobre sinalização intracelular envolvendo tripanossomatídeos abordam as vias disparadas nas células

hospedeiras de mamíferos, em resposta à presença desses parasitos (BURLEIGH & ANDREWS, 1998). Desta maneira, pouco se sabe sobre a transdução de sinais que ocorre nesses parasitos, a partir de estímulos externos a eles, inclusive durante a interação com seus hospedeiros (PARSONS & RUBEN, 2000). Resultados de nosso laboratório demonstraram que o PAF é capaz de modular a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por *L. amazonensis* (ROSA *et al.*, 2001). Desta maneira, um dos objetivos de nosso trabalho foi o de analisar os efeitos do PAF e de diversos moduladores de sinalização intracelular na interação de *L. chagasi* com células de linhagem contínua (LL-5) de seu vetor, *Lu. longipalpis*.

O tratamento de *L. amazonensis* com PAF induziu um aumento de 46% na infecção, que foi inibida com WEB 2086. Além disso, o mesmo efeito foi encontrado utilizando-se um inibidor da PKC, sugerindo que a ação do PAF nesse sistema ocorre através da ligação ao seu receptor de membrana, com ativação desta enzima. Quando os macrófagos são tratados com PAF, a infecção diminui, pois o PAF estimula a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos, aumentando a resistência à infecção pelos parasitos (LONARDONI, RUSSO & JANCAR, 2000).

Neste trabalho, o PAF foi capaz de aumentar a infecção de células LL-5 de *Lu. longipalpis* por *L. chagasi*, em cerca de 100% (Fig. 34). Porém, quando somente as células LL-5 foram tratadas, ou as células e os parasitos foram tratados com PAF, nenhum efeito significativo foi observado. Uma possível explicação para essa diferença entre o resultado encontrado com macrófagos infectados com *L. amazonensis* é que os tipos de células utilizadas são diferentes. Na natureza, os macrófagos são infectados por formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania*, provenientes da saliva do inseto vetor. Esses protozoários penetram nos macrófagos, se diferenciam para as formas amastigotas, se multiplicam, rompem os macrófagos, ganhando a circulação sanguínea, infectando outros macrófagos. O PAF promove um aumento na produção de NO, que é um importante mecanismo de defesa dos macrófagos contra a infecção por *Leishmania*. Entretanto, as formas promastigotas de *Leishmania* não infectam células do vetor, já que seu desenvolvimento é restrito ao lúmen do aparelho digestivo, com ligação dos parasitos ao epitélio, mas sem ocorrência de invasão das células (KAMHAWI,

2006). Talvez essa natureza diferente dos tipos celulares e do tipo de interação seja o motivo pelo qual o PAF não exerça efeito sobre as células LL-5.

O tratamento das formas promastigotas de *L. chagasi* com WEB 2086, seguido do tratamento com PAF, mostra mais uma vez que o WEB 2086 inibe a ação promovida pelo PAF, corroborando também nesse sistema que o PAF atua através da ligação ao seu receptor específico na superfície das células.

O inibidor da PK C, BIS I, provocou uma pequena redução no índice de associação quando os parasitos foram incubados com este inibidor. A modulação mais significativa foi quando os parasitos foram tratados com BIS I antes do tratamento com PAF, o que levou a uma redução de mais de 30% na infecção dos parasitos, quase que inibindo totalmente o aumento causado pelo PAF e retornando aos níveis de infecção semelhantes ao controle (Fig. 36). Quando somente as células LL-5 ou ambas as células foram tratadas, não houve diferença significativa, com exceção de quando ambas as células foram tratadas com BIS I, levando a uma redução de cerca de 20% na associação dos parasitos (Fig. 37).

O tratamento com TBB, um inibidor de CK2, provocou uma redução de 21% quando somente os parasitos foram tratados, 26% quando somente as células LL-5 foram tratadas com TBB e PAF, e uma redução de quase 50% quando ambas as células foram tratadas com TBB, e com TBB e PAF. O efeito do TBB nas células separadas não é grande, porém, quando ambas as células são tratadas, ocorre uma grande inibição do índice de associação (Fig. 38 e 39).

Já a toxina pertussis, que é um inibidor de proteína G inibitória, mostrou modulação significativa somente quando os parasitos foram tratados, levando a uma redução de aproximadamente 37% e 16% quando tratados somente com a toxina, e com a toxina adicionada de PAF, respectivamente (Fig. 40 e 41). Estes resultados de interação das células LL-5 com *L. chagasi* mostram que a maioria dos efeitos ocorre quando os parasitos são tratados, sugerindo que a participação das vias de transdução de sinais envolvendo proteína G, PKC e CK2 nos parasitos deve estar relacionada com a capacidade de associação às células LL-5.

É interessante observar que, na associação de *L. chagasi* com células de linhagem contínua de mosquitos *Aedes albopictus* (C6/36), o índice de

associação máximo encontrado foi de pouco mais de 30% (dados não mostrados). Já o índice de associação mais alto para o sistema de interação de LL-5 com *L. chagasi* foi de quase 90%, provavelmente devido à especificidade deste último modelo, tendo em vista que a espécie de flebotomíneo responsável pela transmissão da *L. chagasi* é *Lu. longipalpis* (SUNDAR & CHATTERJEE, 2006).

## **VI. CONCLUSÕES**

### **1. Postura e eclosão de ovos de fêmeas de *R. prolixus* em diferentes temperaturas:**

Somente as fêmeas submetidas a temperaturas entre 18 e 38°C foram capazes de colocar ovos; não houve postura em temperaturas acima e abaixo dessa faixa. Entretanto, nenhum dos ovos postos na temperatura de 38°C eclodiu. A melhor temperatura para a postura de ovos foi a de 22°C, e esses mesmos ovos apresentaram a maior taxa de eclosão. Considerando o total de ovos, a maioria levou de 15 a 17 dias após a postura para eclodir.

Quando analisamos a eclosão de ovos controle em diferentes temperaturas, obtivemos uma faixa mais estreita: somente entre as temperaturas de 24 e 34°C os ovos são capazes de eclodir. E a maioria dos ovos demorou entre 11 e 13 dias para eclodir.

### **2. Ação do conteúdo do intestino de *T. infestans* sobre a população de bactérias simbiotes presente no estômago:**

A presença do conteúdo do intestino de *T. infestans* foi capaz de reduzir o crescimento de bactérias presentes em seu estômago. Sugerimos que esse efeito é provocado pela atividade da catepsina D, uma vez que ele foi abolido quando usamos o inibidor específico desta enzima.

### **3. Infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*:**

Como os insetos foram infectados ainda no primeiro estágio de ninfa, foram encontrados muito poucos parasitos na região do estômago. A quantidade de células de *T. cruzi*, que se encontrava baixa no intestino dos insetos em jejum, sofreu um pequeno aumento no 3º dia, mas reduziu novamente no 5º dia. No reto, a quantidade de parasitos, que era relativamente alta, sofreu uma queda até o 5º dia, e tanto no intestino quanto no reto o número de células de *T. cruzi* aumentou bastante no 10º dia após a alimentação.

Dos parasitos achados no intestino, a maioria se encontrava na forma epimastigota, seguida das formas intermediárias entre epimastigota e tripomastigota. Já no reto, a principal forma encontrada foi esferomastigota, seguida das formas amastigotas e tripomastigotas.

Estudos subseqüentes estão sendo realizados a fim de relacionar a atividade de catepsinas e desenvolvimento das bactérias simbiotes no decorrer da infecção de *T. infestans* por *T. cruzi*.

### **4. Efeito do PAF na interação de *T. cruzi* com *R. prolixus*:**

O PAF foi capaz de aumentar em mais de 3 vezes o número de epimastigotas de *T. cruzi* ligados ao intestino de *R. prolixus*, quando os parasitos foram tratados com PAF. O tratamento com WEB 2086 reverteu o aumento provocado pelo PAF, mais uma vez indicando que este efeito deve ocorrer pela ligação do PAF ao seu receptor específico.

Quando os insetos foram alimentados com epimastigotas tratados previamente com PAF, houve um aumento de cerca de 4 vezes no número de parasitos encontrados no aparelho digestivo de *R. prolixus*. O WEB 2086, antagonista do PAF, foi capaz de inibir o efeito do PAF, indicando que este efeito deve ocorrer pela ligação do PAF ao seu receptor específico.

Os epimastigotas tratados com PAF apresentaram carga de superfície mais negativa e uma maior quantidade de ácido siálico que os parasitos controle.

## 5. Efeito do PAF e de moduladores de sinalização intracelular na interação de *L. chagasi* com cultura de células de *Lu. longipalpis* “in vitro”:

O tratamento de promastigotas de *L. chagasi* com PAF levou a um aumento de cerca de 100% no índice de associação destes parasitos com células LL-5. Sugerimos o envolvimento de vias de sinalização celular com participação de proteína G, PKC e CK2, uma vez que inibidores dessas proteínas interferem na interação dos epimastigotas com as células LL-5.

## VII. REFERÊNCIAS

- ALLENDE, J.E. & ALLENDE, C.C. **Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation.** *FASEB J.*, 9(5), 313-323, 1995.
- AMBROSIO, A.R. & DE MESSIAS-REASON, I.J. ***Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism.** *Parasite Immunol.*, 27(9), 333-340, 2005.
- ANDREWS, N.W. **Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *Trends Cell Biol.*, 5(3), 133-137, 1995.
- ANEZ, N.; NIEVES, E. & CAZORLA, D. **The validity of the developmental pattern in the sandfly gut for classification of *Leishmania*.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83, 634-635, 1989.
- ARRIGHI, R.B.; LYCETT, G.; MAHAIRAKI, V.; SIDEN-KIAMOS, I. & LOUIS, C. **Laminin and the malaria parasite's journey through the mosquito midgut.** *J. Exp. Biol.*, 13, 2497-2502, 2005.
- BARROS, V.C.; OLIVEIRA, J.S.; MELO, M.N. & GONTIJO, N.F. ***Leishmania amazonensis*: Chemotaxic and osmotaxic responses in promastigotes and their probable role in development in the phlebotomine gut.** *Exp. Parasitol.*, 112, 152-157, 2006.
- BATES, P.A. **The developmental biology of *Leishmania* promastigotes.** *Exp. Parasitol.*, 79, 215-218, 1994.
- BAYOH, M.N. & LINDSAY, S.W. **Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae sensu strictu* (Diptera: Culicidae).** *Bull. Entomol. Res.*, 93, 375-381, 2003.
- BEARD, C.B.; DURVASULA, R.V. & RICHARDS, F.F. **Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission.** *Emerg. Infect. Dis.*, 4(4), 581-591, 1998.
- BEARD, C.B.; DOTSON, E.M.; PENNINGTON, P.M.; EICHLER, S.; CORDON-ROSALES, C. & DURVASULA, R.V. **Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease.** *Int. J. Parasitol.*, 31, 621-627, 2001.
- BEARD, C.B.; CORDON-ROSALES, C. & DURVASULA, R.V. **Bacterial symbiont of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission.** *Annu. Rev. Entomol.*, 47, 123-141, 2002.
- BECKER, S. & JAFFE, C.L. **Effect of protein kinase inhibitors on the growth, morphology, and infectivity of *Leishmania* promastigotes.** *Parasitol. Res.*, 83(3), 273-280, 1997.

- BENVENISTE, J.; HENSON, P.M. & COCHRANE, C.G. **Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor.** J. Exp. Med., 136(6), 1356-1377, 1972.
- BORGES, E.C.; MACHADO, E.M.M. GARCIA, E.S. & AZAMBUJA, P. **Trypanosoma cruzi: Effect of infection on cathepsin D activity in the midgut of Rhodnius prolixus.** Exp. Parasitol., 112, 130-133, 2006.
- BOWEN, I.B.R. & FLYNN, I.W. **Biology of the Kinetoplastida.** In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D.E., eds. Academic Press, London, vol.1, pp. 453-476, 1976.
- BOZZA, P.T.; CASTRO FARIA NETO, H.C.; SILVA, A.R.; LARANJEIRA, A. P.; SILVA, P.M.R; MARTINS, N.A. & CORDEIRO, R.B.S. **Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophils and platelet-activating factor.** Europ. J. Pharmacol., 270, 143-149, 1994.
- BRANDÃO, A.A., MIRANDA, A., DEGRAVE, W.M. & SOUSA, M.A. **The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analysed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications.** Parasitol. Res., 86, 809-812, 2000.
- BRAZ, G.R.C.; ABREU, L.; MASUDA, H. & OLIVEIRA, P.L. **Heme biosynthesis and oogenesis in the blood-sucking bug, Rhodnius prolixus.** Insect. Bioch. Mol. Biol., 31, 359-364, 2001.
- BRENER, Z. **A new aspect of Trypanosoma cruzi life cycle in invertebrate host.** J. Protozool., 19, 23-27, 1972.
- BRENER, Z. & ANDRADE Z.A. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas,** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1979.
- BROWNLIE J.C. & JOHNSON, K.N. **Symbiont-mediated protection in insect hosts.** Trends Microbiol., 17(8), 348-354, 2009.
- BUTCHER, B.A.; TURCO, S.J.; HILTY, B.A.; PIMENTA, P.F.; PANUNZIO, M. & SACKS, D.L. **Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a Leishmania major lipophosphoglycan mutant adversely influences the Leishmania-sand fly interaction.** J. Biol. Chem., 271(34), 20573-20579, 1996.
- BURLEIGH, B.A. & ANDREWS, N.W. **Signaling and host cell invasion by Trypanosoma cruzi.** Curr. Opin. Microbiol., 1(4), 461-465, 1998.
- CAMPBELL, W.B. & HALUSHUKA, P.V. **Lipid-derived autacoids. Eicosanoids and Platelet-activating factor.** In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 611-617. Goodman and Gilman's, 9th ed, 1996.
- CABRAL, M.O.; AZAMBUJA, P.; GOTTLIEB, O.R.; KLEFFMANN, T.; GARCIA, E.S. & SCHAUB, G.A. **Burchellin: effect on Triatoma infestans and on Trypanosoma cruzi within this vector.** Parasitol. Res., 87, 730-735, 2001.
- CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F. & GALVAO, C. **Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposal for taxonomic arrangements.** Entomol. Vect., 7(1), 1-99, 2000.
- CARVALHO, R.U.; GIRÓN, G.; JURBERG, J. & LENT, H. **Elenco bibliográfico dos Triatominae americanos (Hemiptera: Reduviidae).** In: Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas; vol. I, 15-25. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 1997.
- CAVALCANTE, R.R.; PEREIRA, M.H.; FREITAS, J.M. & GONTIJO, N.F. **Ingestion of saliva during carbohydrate feeding by Lutzomyia longipalpis (Diptera; Psychodidae).** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 101(1), 85-87, 2006.
- CHANIOTIS, B.N. **Sugar-feeding behavior of Lutzomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions.** J. Med. Entomol., 11(1), 73-79, 1974.
- CHARLAB, R. & RIBEIRO, J.M.C. **Cytostatic effect of Lutzomyia longipalpis salivary gland homogenates on Leishmania parasites.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 48, 831-838, 1993.
- CHARLAB, R.; TESH, R.B.; ROWTON, E.D. & RIBEIRO, J.M.C. **Leishmania amazonensis: sensitivity of different promastigote morphotypes to salivary gland homogenates of the sand fly Lutzomyia longipalpis.** Exp. Parasitol., 80, 167-175, 1995.

- CHAO, W.; OLSON, M. **Platelet-activating factor: receptor and signal transduction.** *Bioch. J.*, 292, 617-629, 1993.
- CLARK, N. **The effect of temperature and humidity upon the eggs of the bug, *Rhodnius prolixus* (Heteroptera, Reduviidae).** *J. Anim. Ecol.*, 4, 82-87, 1935.
- COLLI, W. & ALVES, M.J.M. **Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94(Suppl. I): 37-49, 1999.
- CORTEZ, M; ATAYDE, V. & YOSHIDA, N. **Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*.** *Microbes Infect.*, 8(6), 1502-1512, 2006.
- COSTA, C.H.; STEWART, J.M.; GOMES, R.B.; GARCES, L.M.; RAMOS, P.K.; BOZZA, M.; SATOSKAR, A.; DISSANAYAKE, S.; SANTOS R.S.; SILVA, M.R.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R. & MAGUIRE, J.H. **Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*.** *Am J. Trop. Méd. Hyg.*, 66(4), 334-337, 2002.
- DANTAS-TORRES, F. & BRANDÃO-FILHO, S.P. **Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 48(3), 151-156, 2006.
- DASCH, G.A.; WEISS, E. & CHANG, K. **Endosymbionts of insects.** In: Krieg, N. R. (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, 811-833. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1984.
- DE LANA, M. & TAFURI, W.L. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas.** In: *Parasitologia Humana*. 11ª ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.
- DESCOTEAUX, A. & TURCO, S.J. **Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1455, 341-352, 1999.
- DESJEUX, P. **Leishmaniasis : current situation and new perspectives.** *Comp. Immun. Microb. Inf. Dis.*, 27, 305-318, 2004.
- DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Int. Rev. Cytol.*, 86, 197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. **Components of the cell surface of tripanosomatids.** *Prog. Parasitol.*, 3, 87-184, 1989.
- DE SOUZA, W. **Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa.** *Micron.*, 26, 405-403, 1995.
- DE SOUZA W. **From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality.** *Kinetoplastid. Biol. Dis.*, 1, 3-18, 2002.
- DIAS, E. **Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 28, 1-111, 1934.
- DIAS, J.C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. **The impact of Chagas disease control in Latin America: a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 97(5), 603-612, 2002.
- DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, M.H. & ESPÍNOLA, H.N. **Hemiptera.** In: *Parasitologia Humana*. 10ª ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2000.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. **Acidocalcisome: a novel Ca<sup>+2</sup> storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites.** *Parasitol. Today*, 15(11), 443-448, 1999.
- DOLFINI, S.; COURGEON, A.M. & TIEPOLO, L. **The cell cycle of an established line of *Drosophila melanogaster* cells in vitro.** *Experientia.*, 26(9): 1020-1021, 1970.
- DOTSON, E.M.; PLIKAYTIS, B.; SHINNICK, T.M.; DURVASULA, R.V. & BEARD, C.B. **Transformation of *Rhodococcus rhodnii*, a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*, with integrative elements of the L1 mycobacteriophage.** *Infect. Genet. Evol.*, 3(2), 103-109, 2003.
- DURVASULA, R.V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R.B.; RICHARDS, F.F. & BEARD, C.B. **Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94(7), 3274-8, 1997.
- DURVASULA, R.V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; TANEJA, J.; KANG, A.S.; CORDON-ROSALES, C.; RICHARDS, F.F.; WHITHAM, R.G. & BEARD, C.B. **Expression of a**



- functional antibody fragment in the gut of *Rhodnius prolixus* via transgenic bacterial symbiont *Rhodococcus rhodnii*.** Med. Vet. Entomol., 13(2), 115-119, 1999.
- DURVASULA, R.V.; SUNDARAM, R. K.; KIRSCH, P.; HURWITZ, I.; CRAWFORD, C.V.; DOTSON, E. & BEARD, C.B. **Genetic transformation of a *Corynebacterial* symbiont from the Chagas disease vector *Triatoma infestans*.** Exp. Parasitol., 119(1), 94-98, 2008.
- DUTRA, P.M.; RODRIGUES, C.O.; JESUS, J.B.; LOPES, A.H.; SOUTO-PADRON, T. & MEYER-FERNANDES, J.R. **A novel ecto-phosphatase activity of *Herpetomonas muscarum muscarum* inhibited by platelet-activating factor.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 253(1), 164-169, 1998.
- DUTRA, P.M.L., RODRIGUES, C.O., ROMEIRO, A., GRILLO, L.A.M., DIAS, F.A., ATTIAS, M., DE SOUZA, W., LOPES, A.H.C.S. & MEYER-FERNANDES, J.R. **Characterization of ectophosphatase activities in trypanosomatid parasites of plants.** Phytopathol., 90(9), 1032-1038, 2000.
- DUTRA, P.M.; COUTO, L.C.; LOPES, A.H. & MEYER-FERNANDES, J.R. **Characterization of ecto-phosphatase activities of *Trypanosoma cruzi*: a comparative study between Colombian and Y strains.** Acta Trop., 100(1-2), 88-95, 2006.
- DUTRA, P.M.; VIEIRA, D.P.; MEYER-FERNANDES, J.R.; SILVA-NETO, M.A.C. & LOPES, A.H.C.S. **Stimulation of *Leishmania tropica* protein kinase CK2 activities by platelet-activating factor (PAF).** Acta Trop., 111(3), 247-254, 2009.
- EBERT, F. & SCHAUB, G.A. **The characterization of Chilean and Bolivia *Trypanosoma cruzi* stocks from *Triatoma infestans* by isoelectrofocusing.** Z. Parasitenkd., 69, 283-290, 1983.
- EICHLER, S. **Interaktionen von Triatominen mit ihren Symbionten und Trypanosomatiden.** PhD dissertation, Fac. Biology, Ruhr University Bochum, Germany, 1998.
- EICHLER, S. & SCHAUB, G.A. **Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with tripanosomatids.** Exp. Parasitol., 100, 17-27, 2002.
- ERIKSON, D. **The pathogenic aerobic organisms of the *Actinomyces* group.** Med. Res. Council Special Report Series, 203, 5-61, 1935.
- FAMPA, P.; CORREA-DA-SILVA, M.S.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, S.M.P.; MOTTA, M.C.M. & SARAIVA, E.M.B. **Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines.** Int. J. Parasitol., 33, 1019-1026, 2003.
- FERREIRA, I. DE L. & SILVA, T.P. **Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact.** Rev. Soc Bras. Med. Trop., 39(5), 507-9, 2006.
- FIECK, A.; HURWITZ, I.; KANG, A.S. & DURVASULA, R. ***Trypanosoma cruzi*: synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts.** Exp. Parasitol., 125(4), 342-347, 2010.
- FLAWIÁ, M.M., TÉLLEZ-IÑÓN, M.T. & TORRES, H.N. **Signal transduction mechanisms in *Trypanosoma cruzi*.** Paras. Today, 13(1), 30-33, 1997.
- FRIEND, W.G.; CHOY, C.T. & CARTWRIGHT, E. **The effect of nutrient intake on the development and the egg production of *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera: Reduviidae).** Can. J. Zool., 43(6), 891-904, 1965.
- GARCIA, E.S. & AZAMBUJA, P. **Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*.** In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 41-47. Brener, Z. & Andrade Z.A., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979.
- GARCIA, E.S. & AZAMBUJA, P. **Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector.** Parasitol. Today, 7(9), 240-244, 1991.
- GIBSON, W. & BAILEY, M. **The development of *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly midgut observed using green fluorescent trypanosomes.** Kinetoplastid Biol. Dis., 2(1), 1, 2003.
- GOMES, M.T.; MONTEIRO, R.Q.; GRILLO, L.A.; LEITE-LOPES, F.; STROEDER, H.; FERREIRA-PEREIRA, A.; ALVIANO, C.S.; BARRETO-BERGTER, E.; NETO, H.C.; CUNHA E

- SILVA, N.L.; ALMEIDA, I.C. SOARES, R.M. & LOPES, A.H. **Platelet-activating factor-like activity isolated from *Trypanosoma cruzi***. Int. J. Parasitol., 36(2), 165-173, 2006.
- GOUILL, C.L.; PARENT, J.L.; PLESZCZYNSKI, M.R. & STANKOVÁ. **Structural and functional requirements for agonist-induced internalization of the human platelet-activating factor receptor**. J. Biol. Chem., 272(34), 21289-21295, 1997.
- GOSSAGE, S.M., ROGERS, M.E. & BATES, P.A. **Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies : implications for understanding the life cycle**. Int.J. Parasitol., 33, 1027-1034, 2003.
- GRACE, T. **Establishment of a line of mosquito (*Aedes aegypti* L.) cells grown in vitro**. Nature, 211, 366-367, 1966.
- GRIMALDI, G. & TESH, R.B. **Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research**. Clin. Microb. Rev., 6(3), 230-250, 1993.
- HEDGES, L.M.; BROWNLIE, J.C.; O'NEILL, S.L. & JOHNSON, K.N. ***Wolbachia* and virus protection in insects**. Science, 322(5902), 702, 2008.
- HOARE, C.A. **The classification of mammalian trypanosomes**. Ergeb. Mikrobiol. Immunitätsforsch. Exp. Ther., 39, 43-57, 1966.
- HOARE, C.A & WALLACE, F.G. **Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology**. Nature, 212, 1385-1386, 1966.
- HONDA, Z.I., NAKAMURA, M., MINAMI, M., WATANABE, T., SEYAMA, Y., OKADO, H., TOH, H., ITO, K., MIYAMOTO, T. & SHIMIZU, T. **Cloning by functional expression platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung**. Nature, 349, 342-346, 1991.
- HOTEZ, P.J., MOLINEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS J.D. & SAVIOLI, L. **Control of neglected tropical diseases**. N. Engl. J. Med., 357(10), 1018-27, 2007.
- HUMMEL, K.; ERDMAN, D.; HEATH, J. & BELLINI W. **Baculovirus expression of the nucleoprotein gene of measles virus and utility of the recombinant protein in diagnostic enzyme immunoassays**. J. Clin. Microbiol., 30, 2874-2880, 1992.
- HUNTER, T. **Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling**. Cell., 80(2), 225-36, 1995.
- HYPSA, V.; TIETZ, F.D.; ZRZAVY, J.; REGO, R.O.M.; GALVÃO, C. & JURBERG, J. **Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade**. Mol. Phylog. Evol., 23, 447-457, 2002.
- IIG, T. **Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals**. Med. Microbiol. Immunol., 190, 13-17, 2001.
- ISHII, S. & SHIMIZU, T. **Platelet-activating factor (PAF) and genetically engineered PAF receptor mutant mice**. Prog. Lipid Res., 39, 41-82, 2000.
- ISHII, S.; NAGASE, T. & SHIMIZU, T. **Platelet-activating factor receptor**. Prostaglandins Other Lipid Mediat., 68-69, 599-609, 2002.
- JERONIMO, S.M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R.F.; CHENG, C.; MONTEIRO, G.R.; NASCIMENTO, E.T.; MARTINS, D.R.; KARPLUS, T.M.; XIMENES, M. F.; OLIVEIRA, C.C.; PINHEIRO, V.G.; PEREIRA, W.; PERALTA, J. M.; SOUSA, J.; MEDEIROS, I.M.; PEARSONI, R.D.; BURNS, T.L.; PUGH, E.W. & WILSON, M.E. **An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil**. Scand. J. Infect. Dis., 36(6-7), 443-449, 2004.
- JUÁREZ, M.P. & FERNANDEZ, G.C. **Cuticular hydrocarbons of triatomines**. Comp. Biochem. Physiol. 147(A), 711-730, 2007.
- KAMHAWI, S. **Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?** Trends Parasitol., 22(9), 436-45, 2006.
- KARISSON, K. **Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria**. Annu. Rev. Biochem., 58, 309-351, 1989.

- KITAMURA, S. **Establishment of cell line from Culex mosquito**. Kobe. J. Med. Sci., 16(1), 41-50, 1970.
- KOLLIEN, A.H.; WANIEK, A.J.; NISBET A.J.; BILLINGSLEY, P.F. & SCHAUB, G.A. **Activity and sequence characterization of two cysteine proteases in the digestive tract of the reduviid bug *Triatoma infestans***. Insect Mol. Biol., 13(6), 569-579, 2004.
- KOLLIEN, A.H. & SCHAUB, G. A. **The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae**. Parasitol. Today, 16(9), 381-387, 2000.
- KULIKOV, V.I. & MUZYA, G.I. **Ether lipids and platelet-activating factor: evolution and cellular function**. Bioch. (Moscow), 62, 1103-1108, 1997.
- LAINSON, R.; WARD, R. D. & SHAW, J. J. **Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis***. Nature, 266, 628-630, 1977.
- LI, X.; GUAN, B.; MAGHAMI, S. & BIEBERICH, C.J. **NKX3.1 is regulated by protein kinase CK2 in prostate tumor cells**. Mol Cell Biol., 26(8), 3008-3017, 2006.
- LIRA, R., ROSALES-ENCINA, J.L. & ARGUELLO, C. ***Leishmania mexicana*: binding of promastigotes to type I collagen**. Exp. Parasitol., 85, 149-157, 1997.
- LITCHFIELD, D.W. **Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death**. Biochem. J., 369(1): 1-15, 2003.
- LONARDONI, M.V.; RUSSO, M. & JANCAR, S. **Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection**. Infect. Immun., 68(11), 6355-6361, 2000.
- LOPES, A.H.C.S.; DUTRA, P.M.L.; RODRIGUES, C.O.; SOARES, M.J.; ANGLUSTER, J. & CORDEIRO, R.B.S. **Effect of platelet-activating factor on cell differentiation of *Herpetomonas muscarum muscarum***. J. Eukariot. Microbiol., 44(4), 321-325, 1997.
- LUTZ, A. & NEIVA, A. **Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil**. Mem. Inst. O. Cruz, 4, 84-95, 1912.
- MACHADO, E.M.M.; AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. **WEB 2086, a platelet-activating factor antagonist, inhibits prophenoloxidase-activating system and hemocyte microaggregation reactions induced by *Trypanosoma rangeli* infection in *Rhodnius prolixus* hemolymph**. J. Ins. Physiol., 52, 685-692, 2006.
- MANNING, G.; PLOWMAN, G.D.; HUNTER, T. & SUDARSANAM, S. **Evolution of protein kinase signaling from yeast to man**. Trends. Biochem. Sci. 27(10), 514-520, 2002.
- MANNING-CELA, R.; JAISHANKAR, S. & SWINDLEB, J. **Life-Cycle and Growth-Phase-Dependent Regulation of the Ubiquitin Genes of *Trypanosoma cruzi***. Arch. Med. Res., 37, 593-601, 2006.
- MANQUE, P.M.; EICHINGER, D.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; ARAYA, J.E. & YOSHIDA, N. **Characterization of the cell adhesion site of *Trypanosoma cruzi* metacyclic stage surface glycoprotein gp82**. Infect. Immun., 68(2), 478-84, 2000.
- MARHOUL, Z. & PUDNEY, M. **A mosquito cell line (MOS. 55) from *Anopheles gambiae* larva**. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66(1), 183-184, 1972.
- MARQUARDT, W.C. & DEMARRE, R.S. **Trypanosomes**. In: Parasitology, 26-40. Macmillan Publishing Company, NY, Collier Macmillan Publishers, London, 1985.
- MASLOV, D. A. & SIMPSON, L. **Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa**. Parasitol. Today, 1(11), 30-32, 1995.
- MASSAD, E. **The elimination of Chagas' disease from Brazil**. Epidem. Infect., 136, 1153-1164, 2008.
- MATTA, M.A.V., ALVIANO, D.C., COUCEIRO, J.N.S.S., MEIRELLES, M.N.L., ALVIANO, C.S. & ANGLUSTER, J. **Cell-surface sialoglycoconjugate structures in wild-type and mutant *Crithidia fasciculata***. Parasitol. Res., 85, 293-299, 1999.
- MCCARROLL, L. & KING, L.A. **Stable insect cell culture for recombinant protein production**. Curr. Opin. Biotechnol., 8(5), 590-594, 1997.

- MCCONVILLE, M.J. **The surface glycoconjugates of parasitic protozoa: potential targets for new drugs.** *Aust. N. Z. J. Med.*, 25(6), 768-76, 1995.
- MCGHEE, R.B. & COSGROVE, W.B. **Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae.** *Microbiol. Rev.*, 44, 140-173, 1980.
- MEGGIO, F. & PINNA, L.A. **One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?** *FASEB J.*, 17(3), 349-368, 2003.
- MICHALICK, M.S.M. **Gênero Leishmania.** In: *Parasitologia Humana*. 10<sup>a</sup> ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2000.
- MICHALICK, M.S.M. **Leishmaniose visceral americana.** In: *Parasitologia Humana*. 11<sup>a</sup> ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2005.
- MIRANDA, K.; DOCAMPO, R.; GRILLO, O.; FRANZEN, A.; ATTIAS, M.; VERCESI, A.; PLATTNER, H.; HENTSCHEL, J. & DE SOUZA, W. **Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in Leishmania parasites.** *Histochem. Cell. Biol.*, 121, 407-418, 2004.
- 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.
- MUKHOPADHYAY, S. & MANDAL, C. **Glycobiology of Leishmania donovani.** *Indian. J. Med. Res.*, 123(3), 203-220, 2006.
- NAULA, C.; PARSONS, M. & MOTTRAM, J.C. **Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania.** *Biochim Biophys Acta.*, 1754(1-2), 151-159, 2005.
- NEVES, D.P. **Filo Arthropoda.** In: *Parasitologia Humana*. 10<sup>a</sup> ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2000.
- OKASHA A.Y.K. **Effects of sub-lethal high temperatures on an insect, Rhodnius prolixus (Stal). I. Induction of delayed moulting and defects.** *J. Exp. Biol.*, 48, 455-463, 1968a.
- OKASHA A.Y.K. **Effects of sub-lethal high temperatures on an insect, Rhodnius prolixus (Stal). II. Mechanism of cessation and delay of moulting.** *J. Exp. Biol.*, 48, 465-473, 1968b.
- OKASHA A.Y.K. **Effects of sub-lethal high temperatures on an insect, Rhodnius prolixus (Stal). III. Metabolic changes and their bearing on the cessation and delay of moulting.** *J. Exp. Biol.*, 48, 475-86, 1968c.
- OLIVEIRA, M.A. & DE SOUZA, W. **An electron microscopic study of penetration by Trypanosoma rangeli into midgut cells of Rhodnius prolixus.** *J. Invertebr. Pathol.*, 77(1), 22-6, 2001.
- PARSONS, M. & RUBEN, L.; **Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids.** *Parasitol. Today* 16(2), 56-62, 2000.
- PARSONS, M.; VALENTINE, M. & CARTER, V. **Proteins kinases in divergent eukaryotes: Identification of protein kinase activities regulated during trypanosome development.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2656-2660, 1993.
- PARSONS, M.; WORTHEY, E.A.; WARD, P.N. & MOTTRAM, J.C. **Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi.** *BMC Genomics.*, 6, 127, 2005.
- 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 cells.** *J. Exp. Med.*, 152(5), 1375-1392, 1980.
- PEREIRA, M.E.; ANDRADE, A.F. & RIBEIRO, J.M. **Lectins of distinct specificity in Rhodnius prolixus interact selectively with Trypanosoma cruzi.** *Science*, 211(4482), 597-600, 1981.
- PIMENTA, P.E., TURCO, S.J. MCCONVILLE, M.J. LAWYER, P.G. PERKINS, P.V. & SACKS, D.L. **Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sand fly midgut.** *Science*. 256(5065), 1812-1815, 1992.

- PODLIPAEV, S.A.; FROLOU, A.O. & KOLESNIKOV, A.A. ***Proteomonas inconstans* n. ge. n. sp. (Kinetoplaastida, Trypanosomatidae), a parasite of bug *Calocoris sexguttatus* (Hemiptera, Miridae).** Parasitologia (Leningrad), 24, 339-345, 1990.
- PRESCOTT, S.M. ZIMMERMAN, G.A., STAFORINI, D.M. & McINTYRE, T.M. **Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators.** Annu. Rev. Biochem., 69, 419-445, 2000.
- PUDNEY, M. & LANAR, D. **Establishment and characterization of a cell line (BTC-32) from the triatomine bug, *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae).** Ann Trop Med Parasitol., 71(1), 109-118, 1977.
- PUDNEY, M.; MARHOUL, Z.; VARMA, M.G. & LEAKE, C. J. **A continuous mosquito cell line from larvae of *Anopheles gambiae*.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 66(1), 21-22, 1972.
- PUNTES, S.M., DA SILVA, R.P., SACKS, D.L., HAMMER, C.H. & JOINER, K.A. **Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5B-9.** J. Immunol., 145, 4311-4316, 1990.
- QUEIROZ, M.J.; ALVES, J.G. & CORREIA, J.B. **Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area.** J. Pediat., 80, 141-146, 2004.
- RAMIREZ, M.I., RUIZ, R.C., ARAYA, J.E., FRANCO DA SILVEIRA, J. & YOSHIDA, N. **Involvement of the stage-specific 82-Kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion.** Infect. Immunity., 61, 3636-3641, 1993.
- RASSI A.J.R.; RASSI, A. & MARIN-NETO, J.A. **Chagas disease.** Lancet, 375(9723), 1388-1402, 2010.
- REY, G.J.; FERRO, C. & BELLO, F.J. **Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95(1), 103-110, 2000.
- REY, L.C.; MARTINS, C.V.; RIBEIRO, H.B. & LIMA, A.A. **American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area.** J. Pediat., 81, 73-78, 2005.
- RIBEIRO, J.M.C. & FRANCISCHETTI, I.M.B. **Platelet-activating-actorhydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*.** Journal of Experimental Biology, 204, 3887-3894, 2001.
- ROCHA, D.S.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.U.; CUNHA, V. & GALVÃO, C. **Influencia da temperatura e umidade na biologia de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 34(4), 357-363, 2001.
- RODRIGUES, C.O.; DUTRA, P.M.; BARROS, F.S.; SOUTO-PADRON, T.; MEYER-FERNANDES, J.R. & LOPES, A.H. **Platelet-activating factor induction of secreted phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi*.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 266(1), 36-42, 1999.
- RODRIGUES, C.O.; DUTRA, P.M.L.; SOUTO-PADRÓN, T. CORDEIRO, R.B.S. & LOPES, A.H.C.S. **Effect of platelet-activating factor on cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*.** Arch. Bioch. Biophys., 223(3), 735-740, 1996.
- RODRIGUEZ, A., RIOULT, M.G., ORA, A. & ANDREWS, N. **A Trypanosome-soluble factor induces IP<sub>3</sub> formation, intracellular Ca<sup>+2</sup> mobilization and microfilaments rearrangement in host cells.** J. Cell Biol., 129, 1263-1273, 1995.
- ROSA, M.S.; VIEIRA, R.B. PEREIRA, A.F. DUTRA, P.M. & LOPES, A.H. **Platelet-activating factor (PAF) modulates peritoneal mouse macrophage infection by *Leishmania amazonensis*.** Curr. Microbiol., 43(1), 33-37, 2001.
- RUBIN-DE-CELIS, S.S.; UEMURA, H.; YOSHIDA, N. & SCHENKMAN, S. **Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole.** Cell. Microbiol., 8(12), 1888-1898, 2006.
- SACERDOTI-SIERRA, N. & JAFFE, C.L. **Release of ecto-protein kinases by the protozoan parasite *Leishmania major*.** J. Biol. Chem., 272(49), 30760-30765, 1997.
- SACKS, D.L., MODI, G., ROWTON, E., SPÄTH, G., EPSTEIN, L., TURCO, S.J. & BEVERLEY, S.M. **The role of phosphoglycan in *Leishmania*-sand fly interactions.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 406-411, 2000.

- SACKS, D.L. **Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence.** Cell Microbiol., 3(4), 189-196, 2001.
- SCHAUB, G.A. **Developmental time and mortality in larvae of the reduviid bugs *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* after coprophagic infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae).** J. Invertebr. Pathol., 51(1), 23-31, 1988.
- SCHAUB, G.A.; KLEFFMANN, T.; KOLLIEN, A.H. & SCHMIDT, J. **Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to the rectal cuticle of *Triatoma infestans* and its influence on metacyclogenesis - a review.** Tokai J. Exp. Clin. Med., 23(6), 321-7, 1998.
- SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M.E. & NUSSENZWEIG, V. **Structural and functional properties of *Trypanosoma trans-sialidase*.** Annu. Rev. Microbiol., 48, 499-523, 1994.
- SCHILMAN, P.E. & LAZZARI, C.R. **Temperature preference in *Rhodnius prolixus*, effects and possible consequences.** Acta Trop., 90, 115-122, 2004.
- SCHLEIN, Y., JACOBSON, R.L. & SHLOMAI, J. **Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector.** Proc. R. Soc. Lond., 245(B), 121-126, 1991.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R.L. & MESSER, G. **Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9944-9948, 1992.
- SCHOFIELD, C.J. & DIAS, J.C. **The Southern Cone Initiative against Chagas disease.** Adv. Parasitol., 42, 1-27, 1999.
- SHAHABUDDIN, M. & PIMENTA, P.F. P. ***Plasmodium gallinaceum* preferentially invades vesicular ATPase-expressing cells in *Aedes aegypti* midgut.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 3385-3389, 1998.
- SHEFFIELD, P.J., GARRARD, S., CASPI, M., AOKI, J., ARAI, H., DEREWENDA, K.I., SUTER, B., REINER, O., DEREWENDA, Z.S., **Homologs of the a- and b-subunits of mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib in the *Drosophila melanogaster* genome.** Proteins, 39, 1-8, 2000.
- SHERLOCK, I.A. **Vetores.** In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 21-40. Brener, Z. & Andrade Z.A., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979.
- SIGIURA, T.; FUKUDA, T.; MIYAMOTO, T. & WAKU, K. **Distribution of alkyl and alkenyl ether-linked phospholipids and platelet-activating factor-like in various species of invertebrates.** Bioch. Biophys. Acta, 1126, 298-308, 1992.
- SILVA-FILHO, F.C.; SANTOS, A.B.S.; DE CARVALHO, T.M. & DE SOUZA, W. **Surface charge of resident, elicited and activated mouse peritoneal macrophages.** J. Leukoc. Biol., 41, 143-149, 1987.
- SILVA-NETO, M.A.; CARNEIRO, A.B.; VIEIRA, D.P.; MESQUITA, R.D. & LOPES, A.H. **Platelet-activating factor (PAF) activates casein kinase 2 in the protozoan parasite *Herpetomonas muscarum muscarum*.** Bioch. Biophys. Res. Commun., 293, 1358-1363, 2002.
- SIQUEIRA, A.M. **Subfilo Mastigophora.** In: Parasitologia Humana. 10ª ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 2000.
- SOARES, R.M.; DE A. SOARES, R.M.; ALVIANO, D.S.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C.S. & TRAVASSOS, L.R. **Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*.** Biochim. Biophys. Acta., 1474(2), 262-8, 2000.
- SOARES, R.P.P.; MACEDO, M.E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N.F.; ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.T.; PIMENTA, P.F.P. & TURCO, S.J. ***Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*.** Mol. Bioch. Parasitol., 121, 213-224, 2002.
- SOARES, R. P. & TURCO, S. J. ***Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review.** Na. Acad. Brás. Cienc., 75(3), 301-330, 2003.
- SOUSA, M.A. & CORTE-REAL, S. **Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia daenei* Carvalho, 1973: proposal of a new genus.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 33(8), 58, 1991.

- SOUTO-PADRÓN, T. **The surface charge of trypanosomatids.** A. Acad. Bras. Ciênc., 74(4), 649-675, 2002.
- STRANGE, K.; DENTON, J. & NEHRKE, K. **Ste20-type kinases: evolutionarily conserved regulators of ion transport and cell volume.** Physiology. (Bethesda), 21, 61-68, 2006.
- SUNDAR, S. & CHATTERJEE, M. **Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities.** Indian J. Med. Res., 123, 345-352, 2006.
- TARDIEUX, I., WEBSTER, P., RAVESLOOT, J., BORON, W., LUNN, J.A., HUSER, J.E. & ANDREWS, N.W. **Lysosome recruitment and fusion are early events required for *Trypanosoma* invasion of mammalian cells.** Cell., 71, 1117-1130, 1992.
- TEIXEIRA, L.; FERREIRA, A. & ASHBURNER, M. **The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*.** PLoS Biol., 6(12), e2, 2008.
- TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. & SVOBODA, M. ***Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles.** Experimental Parasitology, 114(4), 279-288, 2006.
- TESH, R.B. & MODI, G.B. **Development of a continuous cell line from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), and its susceptibility to infection with arboviruses.** J. Med. Entomol., 20(2), 199-202, 1983.
- VAN HAASSTERT, P.J. **Analysis of signal transduction: formation of cAMP, cGMP and Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in vivo and in vitro.** Methods Mol. Biol., 346, 369-392, 2006.
- VICKERMAN, K. **Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes.** Br. Med. Bull., 41(2), 105-14, 1985.
- VICKERMAN, K. **The evolutionary expansion of the tripanosomatid flagellates.** Int. J. Parasitol., 24(8), 1317-1331, 1994.
- VICKERMAN, K. & TETLEY, L. **Flagellar surfaces of parasitic protozoa and their roles in attachment.** In: Ciliary and flagellar membranes, 267-304. Edited by Bloodgood R. A. Plenum Press, New York, 1990.
- VILLALTA, F. & KIERSZEBAUM, F. **The effect of swainsonine on the association of *Trypanosoma cruzi* with host cells.** Mol. Biochem. Parasitol., 16(1), 1-10, 1985.
- WALTERS, L.L. **Leishmania differentiation in natural and unnatural sand fly hosts.** J. Euk. Microbiol., 40, 196-206, 1993.
- WALTER, J.; KINZEL, V. & KUBLER, D. **Evidence for CKI and CKII at the cell surface.** Cell. Mol. Biol. Res., 40(5-6), 473-480, 1994.
- WARREN, L. **The thiobarbituric assay of sialic acids.** J. Biol. Chem., 234, 209-215, 1959.
- WARREN, L.G. **Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate.** J. Parasitol., 46, 529-539, 1960.
- WEBSTER, P. & RUSSEL, D.G. **The flagellar pocket of trypanosomatids.** Parasitol. Today, 9, 201-206, 1993.
- WHO. **Control of Chagas disease.** Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series no 905. Geneva, 2002.
- WIGGLESWORTH V.B. **Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera, Triatomidae).** Parasitol., 28(2), 284, 1936.
- WILSON, M.E. & PEARSON, R.D. **Stage specific variation in lectin binding to *Leishmania donovani*.** Infect. Immun., 46, 128-134, 1984.
- YOSHIDA, N.; FAVORETO, S.JR.; FERREIRA, A.T. & MANQUE, P.M. **Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells.** Braz. J. Med. Biol. Res., 33(3), 269-378, 2000.

## VIII. ANEXOS

# Journal of Biomolecular Screening

<http://jbx.sagepub.com>

---

## Development of a Ligand Blot Assay Using Biotinylated Live Cells

Felipe de Almeida Dias, André Luis Souza dos Santos, Antônio Ferreira-Pereira, Alexandre Romeiro, Luciana Teixeira Zimmermann, Michelle Tanny Cunha do Nascimento, Georgia Correa Atella, Elvira Maria Saraiva, Rafael Linden and Angela Hampshire Lopes

*J Biomol Screen* 2007; 12; 1006

DOI: 10.1177/1087057107307146

The online version of this article can be found at:  
<http://jbx.sagepub.com/cgi/content/abstract/12/7/1006>

---

Published by:

 SAGE Publications

<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:



[Society for Biomolecular Sciences](#)

**Additional services and information for *Journal of Biomolecular Screening* can be found at:**

**Email Alerts:** <http://jbx.sagepub.com/cgi/alerts>

**Subscriptions:** <http://jbx.sagepub.com/subscriptions>

**Reprints:** <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

**Permissions:** <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

**Citations** (this article cites 16 articles hosted on the SAGE Journals Online and HighWire Press platforms):  
<http://jbx.sagepub.com/cgi/content/refs/12/7/1006>



## Development of a Ligand Blot Assay Using Biotinylated Live Cells

FELIPE DE ALMEIDA DIAS,<sup>1</sup> ANDRÉ LUIS SOUZA DOS SANTOS,<sup>1</sup> ANTÔNIO FERREIRA-PEREIRA,<sup>1</sup>  
ALEXANDRE ROMEIRO,<sup>2</sup> LUCIANA TEIXEIRA ZIMMERMANN,<sup>1,3</sup>  
MICHELLE TANNY CUNHA DO NASCIMENTO,<sup>1</sup> GEORGIA CORREA ATELLA,<sup>3</sup>  
ELVIRA MARIA SARAIVA,<sup>1</sup> RAFAEL LINDEN,<sup>2</sup> and ANGELA HAMPSHIRE LOPES<sup>1</sup>

Adhesive interactions between cells are critical to a variety of processes, including host-pathogen relationships. The authors have developed a new technique for the observation of binding interactions in which molecules obtained from excised tissues are resolved by gel electrophoresis and transferred to a membrane. Biotinylated live cells are then kept in contact with that membrane, and their interactions with proteins of interest are detected by peroxidase-labeled streptavidin, followed by a biotin-streptavidin detection system. The adhesion proteins can eventually be identified by cutting the relevant band(s) and performing mass spectrometry or other amino acid-sequencing methods. The technique described here allows for the identification of both known and novel adhesion molecules capable of binding to live cells, among a complex mixture and without previous isolation or purification. This is especially important for the analysis of host-parasite interactions and may be extended to other types of cell-cell interactions. (*Journal of Biomolecular Screening* 2007:1006-1010)

**Key words:** ligand blot, host-parasite, *Oncopeltus fasciatus*, *Phytomonas serpens*, *Leptomonas wallacei*

### INTRODUCTION

**T**RYPANOSOMATIDS are unflagellated protozoa presenting genera that parasitize solely invertebrates and some species that are characterized by having more complex life cycles involving 2 hosts, usually an invertebrate and a vertebrate. Also, there is a group of plant trypanosomatids transmitted by insects. Among the 10 recognized genera of the family Trypanosomatidae, only *Trypanosoma* and *Leishmania* are pathogenic for humans, justifying their active investigation. In contrast, the plant flagellates, *Phytomonas*, have only recently begun to attract attention because

of the devastating damage they cause to agriculture, and the remaining genera, the monoxenic parasites associated with insects, have been largely neglected.<sup>1</sup> Nevertheless, these flagellates have been widely used as a model for eukaryotic biochemistry. Better understanding of the interactions between the monoxenic and plant trypanosomatids with their invertebrate hosts is important not only for this specific group of flagellates but also as a model for vector-borne diseases.

*Phytomonas* is one of the genera of the family Trypanosomatidae, which causes lethal disorders in plants of great economic importance, including oil palms, coconut, coffee trees, and cassava, and it is responsible for ravaging epidemics in South America.<sup>1</sup> The hemipteran insect *Oncopeltus fasciatus* (milkweed bug) harbors several trypanosomatids, including flagellates of the genera *Phytomonas* and *Leptomonas*. The species *Leptomonas wallacei* is an exclusively entomophilic trypanosomatid commonly found in guts.<sup>2</sup> Invasion of the vector salivary glands is one of the most important events for the life cycle of *Phytomonas* species.<sup>1</sup>

Malaria parasites and trypanosomatids are transmitted by insects, and the devastating diseases they cause contribute to significant economic losses as well as to political, social, and economic instability in developing countries.<sup>3</sup> Four hundred

<sup>1</sup>Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Received May 6, 2007, and in revised form Jun 22, 2007. Accepted for publication Jul 17, 2007.

*Journal of Biomolecular Screening* 12(7); 2007  
DOI: 10.1177/1087057107307146

million individuals become infected with and almost 3 million children die of malaria each year in Africa, Asia, and South America. Parasites of the genus *Leishmania* currently affect more than 12 million people all around the world, whereas approximately 18 million people are infected with *Trypanosoma cruzi* in Latin America and 1 million are infected with African trypanosomes. Unfortunately, there is no vaccine available to prevent such diseases, and the problem with drug resistance grows.<sup>4</sup>

Understanding the complexity of the mechanisms involved in pathogenesis caused by protozoan parasites is essential for the successful development of efficient treatment and prophylactic measures. Adhesion is a key aspect of the establishment of disease in both animals and plants. Adhesive interactions anchor the parasite to the host surface and constitute a critical step in the pathogenesis of infection. The parasites may then invade the host cells, producing potent cytopathic effects leading to target cell death. Although a number of adhesin molecules produced by mammalian pathogens have been characterized, molecular details of adhesins of parasites of other animals or plants have been mostly neglected.<sup>5</sup>

Receptor-ligand interactions are usually evaluated using a number of biochemical techniques including radioligand binding, photoaffinity labeling, cross-linking, chemical modification, and site-directed mutagenesis.<sup>6</sup> Blot overlay technique using sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for qualitative and quantitative analysis has been employed for several purposes, including binding of  $\text{Ca}^{2+}$  to a purified kinase of *Paramecium tetraurelia*, description of the structural diversity of type 1 group A topoisomerases, protein-protein interaction of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix, and others.<sup>7-9</sup> In this report, we describe a novel blot overlay assay based on the binding of live flagellates to proteins resolved by SDS-PAGE and transferred to a membrane. The widespread application of this procedure may facilitate the discovery and identification of proteins involved in adhesive interactions of protozoan parasites with their hosts.

## MATERIALS AND METHODS

### Insects

In this study, we used adult *O. fasciatus* kindly provided by Dr. Patricia Azambuja Penna (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil), from which we have established a colony in our laboratory. The insects were kept in plastic pitchers at 26 °C and fed with toasted, peeled sunflower seeds and fresh water.

### Extracted tissues

Adult insects (about 2 cm long) were carefully dissected using sterile stainless steel fine forceps and scissors; both their intact salivary glands and guts were extracted. Each organ was

then placed in sterile 1.5-mL microcentrifuge tubes containing 200  $\mu$ L phosphate-buffered saline (PBS; 150 mM NaCl, 20 mM phosphate buffer, pH 7.2) at 4 °C.

### Parasites

*Phytomonas serpens* promastigotes (isolate 9T, CT-IOC-189) and *L. wallacei* promastigotes (CT-IOC 194) were axenically grown in screwed capped glass tubes (15  $\times$  2 cm) containing 5 mL of a sterile medium (37 g/L brain-heart infusion and 1 mg/L folic acid, supplemented with 10 mg/L hemin and 10% [v/v] fetal bovine serum) at 26 °C. The parasites were maintained by weekly transfers to fresh medium. *P. serpens* flagellates were used at a stationary phase of growth (day 4), and *L. wallacei* flagellates were used both at a log phase (day 2) and at a stationary phase of growth (day 4). Before the assays, the parasites were harvested by centrifugation at 1500g for 10 min at 4 °C. The pellets containing the parasites were then resuspended in PBS pH 7.2 and washed 3 times by centrifugation at 1500g for 10 min at 4 °C. Cellular viability was assessed by observing mobile flagellated parasites under phase-contrast microscopy before and after incubations. The viability of the parasites was never affected by the conditions used in this study.

### SDS-PAGE

Intact glands and guts were frozen in liquid nitrogen in a buffer containing 20 mM Tris-HCl and the protease inhibitors 2 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, 130  $\mu$ M bestatin hydrochloride, 14  $\mu$ M N-(trans-epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide, 1 mM leupeptin hemisulfate salt, 0.3  $\mu$ M aprotinin, 100  $\mu$ M phenylmethylsulphonyl fluoride, and 1% (w/v) SDS, at pH 7.2. After thawing, the glands and guts were homogenized using a Teflon-coated microtissue grinder. Homogenates were centrifuged at 5000g for 10 min at 4 °C, and supernatant aliquots containing the protein extract, corresponding to 80  $\mu$ g protein,<sup>10</sup> were separated by SDS-PAGE at 4 °C, 150 V, and 60 mA. In general, the optimal protein concentration depended on the tissue from which the proteins were extracted, ranging from 60 to 80  $\mu$ g/slot. In the present study, we used 80  $\mu$ g/slot for both salivary glands and guts. Using purified proteins, the optimal protein concentration ranged from 0.5 to 1.0  $\mu$ g/slot. The molecular mass of sample polypeptides was calculated according to the mobility of the full-range rainbow molecular mass standards.

### Gel-membrane protein transfer

Proteins from the gels were transferred at 4 °C, 100 V, 300 mA, for 2 h, in 25 mM Tris-base, 200 mM glycine, and 20% methanol (pH 8.0) to polyvinylidene difluoride (PVDF) or nitrocellulose

membranes using protein transfer cells (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). These membranes can be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for at least 2 mo, for posterior use in overlay assays.

### Biotinylation of parasite surface protein

Suspensions containing  $10^8$  live parasites  $\text{mL}^{-1}$  in PBS, pH 8.0, were treated with  $20\ \mu\text{g}$  Sulfo-NHS-Lc-Biotin per milliliter of reaction volume, for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , as described.<sup>11</sup> The parasites were washed 3 times in PBS, pH 7.2, to remove unbound biotin. Fresh preparations of biotinylated parasites must be obtained for each experiment, as live parasites are required for the overlay assays.

### Incubation of membranes with live biotinylated parasites

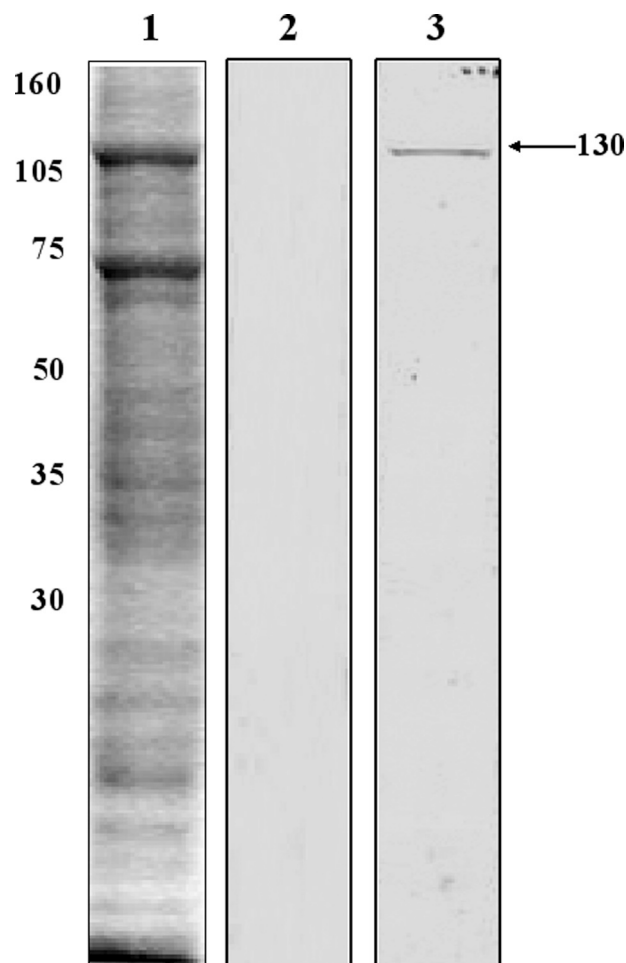
The membranes containing total proteins from the salivary glands or guts were blocked in solution A (150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 1% bovine serum albumin [BSA], 10 mM Tris, pH 7.2), for 15 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , before incubation with the live biotinylated parasites ( $10^7$  cells/mL) in solution A, for 1 h, in a humid chamber at  $26^{\circ}\text{C}$ . After incubation, the blots were washed 3 times in solution B (150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 10 mM Tris, pH 7.2), incubated in solution B containing peroxidase-labeled streptavidin ( $0.1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 1 h at  $26^{\circ}\text{C}$ , and then washed 3 times in solution B. Bands containing bound parasites were detected with an electrochemiluminescence (ECL) kit according to the manufacturer's protocol.

### Chemicals

The constituents of culture medium for the flagellated parasites, reagents used in electrophoresis, buffer components, protease inhibitors, Tween 20, BSA, and peroxidase-labeled streptavidin were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). PVDF and nitrocellulose membranes, full-range rainbow molecular mass standards, and the ECL kit were purchased from Amersham Life Sciences (Piscataway, NJ). Sulfo-NHS-Lc-Biotin was purchased from Pierce Biotechnology (Rockford, IL). All other reagents were analytical grade.

## RESULTS AND DISCUSSION

Release of genetically engineered mosquitoes resistant to parasite infections has been proposed as a novel way to control malaria transmission, and several important advances have been made in anticipation of testing this approach.<sup>12</sup> One of the ultimate goals of our studies is the identification and gene targeting of molecules required for the attachment of *Phytomonas* to milkweed bug salivary glands. **Figure 1** shows the overlay blot of extracted proteins from the salivary glands of *O. fasciatus* transferred to PVDF membrane. In lane 3, probed with biotinylated



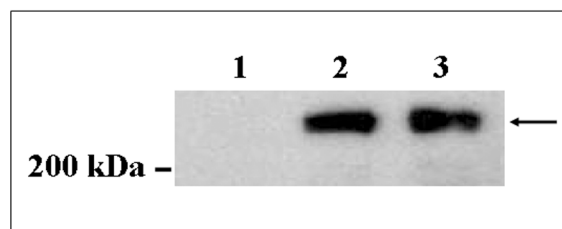
**FIG. 1.** Interaction of live biotinylated *Phytomonas serpens* promastigotes at the stationary phase of growth with salivary gland proteins of *Oncopeltus fasciatus* transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Parasites were overlaid on lane 3 only. Note the band of adhered parasites at 130 kDa. The numbers on the left indicate molecular mass markers expressed in kilodaltons.

live *P. serpens* promastigotes, a sharp band of 130 kDa is observed. Based on the positive result of the experiment shown in **Figure 1**, we proceeded to identify the potential receptor for the parasites. Thus, salivary gland polypeptides were separated by 2-dimensional PAGE, transferred to PVDF membranes, and incubated with live biotinylated promastigotes. Again, the parasites bound to a 130-kDa polypeptide. The spot was cut from the 2-dimensional gels, digested with trypsin, and subjected to peptide mass fingerprint analysis by biospectrometry as described,<sup>13</sup> which allowed identification of the 130-kDa ligand peptide (Dias et al, unpublished data).

**Figure 2** shows the overlay assay of extracted proteins from the guts of *O. fasciatus* probed with biotinylated live *L. wallacei*

promastigotes. In lanes 2 and 3, the blot was probed with biotinylated live promastigotes either at the log phase (lane 2) or stationary phase (lane 3) of growth. A strong band of molecular mass higher than 200 kDa was detected in lanes 2 and 3 (arrow) but not in lane 1, which was not probed with biotinylated live parasites. In other trypanosomatids, such as *Leishmania* spp., the growth phase is essential for parasite binding to the midgut of its insect vector. The differentiation of *Leishmania* promastigotes from a noninfective procyclic stage to an infective metacyclic stage during growth within the midgut of their sand fly vectors or within axenic culture is accompanied by structural modifications of the surface lipophosphoglycan (LPG). The hindrance of terminally exposed galactose residues on metacyclic LPG appears to permit the selective release of infective-stage organisms from adhesion to midgut epithelial cells so as to make them available for subsequent transmission by bite.<sup>14</sup> *Leishmania* spp. and other parasites that are transmitted to vertebrates or plants need to bind tightly to the midgut to multiply; then, they have to be released so as to get to the salivary glands or proboscis of the insect hosts. Conversely, *L. wallacei* parasites are not transmitted to either vertebrates or plants but only to other insects through their feces. Thus, it is expected that *L. wallacei* parasites should bind equally to the midgut, regardless of their growth phase, which was precisely what we observed in **Figure 2**. Considering the interaction of *Phytomonas* spp. with the salivary glands of *O. fasciatus*, the parasites bind to the midgut of the insect and then are released to pass through the midgut epithelial cells and reach the circulatory system (hemolymph), thereby homing at the salivary glands. Accordingly, in previous experiments, we observed that *P. serpens* parasites bind more efficiently to whole salivary glands of *O. fasciatus* when they are at a stationary phase, as opposed to the parasites at the log phase of growth (unpublished data), which justifies the fact that we used only parasites at the stationary phase in the experiment shown in **Figure 1**.

The blot overlay technique using SDS-PAGE has been extensively used for different purposes, but to our knowledge, this is the first assay employing the binding of live cells to extracted proteins transferred to a membrane. Thus, Son and coworkers<sup>7</sup> used this method to bind  $\text{Ca}^{2+}$  to a purified protein kinase from *P. tetraurelia*. Samples were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Similarly, Kozyavkin and coworkers<sup>8</sup> adapted the technique for adenosine triphosphate (ATP) binding to a purified protein (a reversed DNA gyrase from a hyperthermophile bacteria *Methanopyrus kandkri*). The protein was resolved in SDS-PAGE and transferred onto a membrane, which was probed with  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Labrie and coworkers<sup>9</sup> used a dot blot overlay assay to study protein-protein interactions. Toxins from *E. coli* were dotted onto a membrane, which was then incubated with a fusion protein. The dot blots were probed with anti-fusion protein antiserum, and the reaction was developed using a peroxidase-chromogenic substrate method. Also, an electrophoresis blot overlay assay for analyzing carbohydrate-mediated host-parasite interactions in keratitis caused by *Acanthamoeba* was



**FIG. 2.** Interaction of live biotinylated *Leptomonas wallacei* promastigotes with gut proteins of *Oncopeltus fasciatus* transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Parasites were overlaid on lanes 2 and 3; parasites at log (2) and stationary (3) phase of growth. Note the band of adhered parasites at >200 kDa.

described, in which whole  $^{35}\text{S}$ -labeled amoebas were used to bind to mannose-containing glycoproteins isolated and purified from rabbit corneal epithelium.<sup>15</sup> Although somewhat similar to that described here, the latter method is time-consuming because the proteins used for parasite binding were purified prior to the electrophoresis. In addition, the use of biotinylated parasites described here overcomes the need to use radiolabeled parasites. These are extremely important differences with respect to time and safety for performing the experiments. Finally, the protozoan parasites used in the currently described technique were alive when added to the membrane strips, which confers more reliability to the interactions with the protein extracts.

Receptor-ligand interactions have traditionally been evaluated using a number of biochemical techniques including radioligand binding, photoaffinity labeling, cross-linking, and chemical modification. Newell and coworkers<sup>6</sup> claimed that these approaches have largely been superseded by site-directed mutagenesis. These authors focused on site-directed mutagenesis, heterologous expression in eukaryotic cells, and radioligand binding as a methodology to enable the characterization of receptor-ligand interactions. Although this approach is correct and provides sound data, it is time-consuming and reasonably complicated. On the contrary, using the technique we demonstrate in this study along with proteome analysis, one can identify proteins from a crude extract, which are involved with receptor-ligand interactions, in approximately 4 to 5 days.

Most host-parasite interactions are based on receptor-mediated events. The mechanisms that intracellular parasites have developed to both interact with the host cells and escape immune surveillance are complex and intriguing. Many of the most harmful parasitic diseases are transmitted by blood-sucking insect vectors. During this stage of their life cycles, selection pressures favor parasites that can manipulate their vectors to enhance transmission, which includes increasing the amount of contact between the vector and host.<sup>16</sup> Similarly, plant and monoxenic trypanosomatids bear surface molecules for binding to the salivary gland and/or gut of their insect hosts.

In the present study, we show that biotinylated live promastigotes of *P. serpens* and *L. wallacei* bind specifically to proteins

extracted from the salivary glands (Fig. 1) and guts (Fig. 2), respectively, of the phytophagous insect *O. fasciatus*. A similar approach should allow the identification of numerous ligands of other protozoan parasites. Furthermore, studies of other ligand receptor-mediated interactions may benefit from the current approach. Simple modifications, such as the use of nondenaturing gels, may further widen the scope of this technique.

In conclusion, we anticipate that the protocol described here may serve as a model for various other applications aimed at the identification of proteins involved in cell-cell surface interactions.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Marta Branquinha, Claudia D'Avila Levy, Rosângela M. A. Soares, Ednildo Machado, Mário A. Silva-Neto, Pedro L. Oliveira, Eliana B. Bergter, Igor C. Almeida, Marta T. Gomes, and Danielle P. Vieira for valuable discussions. This work was supported by grants from the Brazilian Agencies CNPq, CAPES, FUJB, and FAPERJ.

### REFERENCES

1. Camargo EP: *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol* 1999;42:29-112.
2. Romeiro A, Leal LHM, De Souza W, Attias M: Interaction of *Leptomonas wallacei* with the intestinal tract of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *J Invert Pathol* 2003;82:41-49.
3. Matovu E, Seebeck T, Enyaru JCK, Kaminsky R: Drug resistance in *Trypanosoma brucei* spp., the causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle. *Microb Infect* 2001;3:763-770.
4. Ouassi A, Ouassi M: Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 2005;53:102-114.
5. Haldar K, Kamoun S, Hiller NL, Bhattacharje S, van Ooij C: Common infection strategies of pathogenic eukaryotes. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:922-931.
6. Newell JG, Davies M, Bateson AN: The use of site-directed mutagenesis, transient transfection, and radioligand binding: a method for the characterization of receptor-ligand interactions. *Mol Biotechnol* 2000;14:25-45.
7. Son M, Gundersen RE, Nelson DL: A second member of the novel Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase family from *Paramecium tetraurelia*. *J Biol Chem* 1993;268:5940-5948.
8. Kozyavkin SA, Krah R, Gellert M, Stetter KO, Lake JA, Slesarev AI: A reverse gyrase with an unusual structure. *J Biol Chem* 1994;269:11081-11089.
9. Labrie V, Harel J, Dubreuil JD: Oligomerization of *Escherichia coli* enterotoxin b through its C-terminal hydrophobic  $\alpha$ -helix. *Biochim Biophys Acta* 2001;1535:128-133.
10. Lowry OH, Rozebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
11. Altin JG, Pagler EB: A one-step procedure for biotinylation and chemical cross-linking of lymphocyte surface and intracellular membrane-associated molecules. *Anal Biochem* 1995;224:382-389.
12. James AA: Blocking malaria parasite invasion of mosquito salivary glands. *J Exp Biol* 2003;206:3817-3821.
13. Liska AJ, Shevchenko A: Expanding the organismal scope of proteomics: cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics* 2003;3:19-28.
14. Sacks D, Khamhawi S: Molecular aspects of parasite-vector and vector interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:453-483.
15. Yang Z, Cao Z, Panjwani N: Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infect Immun* 1997;65:439-445.
16. Hurd H: Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu Rev Entomol* 2003;48:141-161.

Address correspondence to:

Angela Hampshire Lopes  
 Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes  
 Universidade Federal do Rio de Janeiro  
 CCS, Bloco I, Avenida Carlos Chagas Filho  
 373 Cidade Universitária  
 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, CEP 21941-902

E-mail: angela.lopes@micro.ufrj.br



**Effects of platelet-activating factor on the interaction of  
Trypanosoma cruzi with Rhodnius prolixus**

Journal:	<i>Parasitology Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Zimmermann, Luciana; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Folly, Evelize; Universidade Federal Fluminense Gomes, Marta; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica Médica Alviano, Daniela; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Alviano, Celuta; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Costa e Silva Filho, Fernando; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho Atella, Georgia; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica Lopes, Angela; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia
Keywords:	Trypanosoma cruzi, Rhodnius prolixus, parasite-insect interaction, PAF, surface charge, sialic acid



1

2 **SHORT COMMUNICATION**

3

4 Effects of platelet-activating factor on the interaction of

5 *Trypanosoma cruzi* with *Rhodnius prolixus*

6

7 Luciana T. Zimmermann<sup>a</sup>, Evelize Folly<sup>b</sup>, Marta T. Gomes<sup>a,c</sup>, Daniela S. Alviano<sup>a</sup>,8 Celuta S. Alviano<sup>a</sup>, Fernando C. Silva-Filho<sup>d</sup>, Georgia C. Atella<sup>c</sup> and Angela H. Lopes<sup>a,\*</sup>

9

10 <sup>a</sup> *Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro,*11 *Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, R.J., Brazil*

12

13 <sup>b</sup> *Departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal*14 *Fluminense, Centro, 24 020-141, Niterói, R.J., Brazil*

15

16 <sup>c</sup> *Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade*17 *Universitária, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, R.J., Brazil*

18

19 <sup>d</sup> *Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade*20 *Universitária, Ilha do Fundão, 21941-590, Rio de Janeiro, R.J., Brazil*

21

22 \*Corresponding author: Tel: + 55-21-2562-6740; fax: + 55-21-2560-8344.

23 *E-mail address: angela.lopes@micro.ufrj.br (A.H. Lopes).*

24 **Abstract**

25

26 We investigated the effects of platelet-activating factor (PAF) on the interaction  
27 of *Trypanosoma cruzi* with *Rhodnius prolixus*. The parasites (epimastigotes) were  
28 treated with PAF and/or WEB 2086 (PAF antagonist) for 1 h prior to the interaction  
29 experiments. PAF stimulated both *in vivo* and *ex vivo* interactions between *T. cruzi* and  
30 *R. prolixus*, while WEB 2086 abrogated these effects. PAF-treated epimastigotes also  
31 showed an increase in surface negativity and in the amount of surface sialic acid.  
32 Neither of these effects was observed when the epimastigotes were treated with  
33 neuraminidase following PAF treatment. In the *ex vivo* interaction experiments, the  
34 number of epimastigotes bound to the midguts of the insects was reduced when the  
35 epimastigotes had been treated with neuraminidase.

36

37 **Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius prolixus*, parasite-insect interaction, PAF,  
38 surface charge, sialic acid.



## 39 1. Introduction

40

41 Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* infection, is an endemic source of  
42 morbidity and mortality in Latin America and an emerging health problem in Europe  
43 and the USA (Carod-Artal et al. 2010). Recognized by the WHO as one of the world's  
44 13 most neglected tropical diseases, Chagas disease affects about 8 million people in  
45 Latin America, and of these, 30-40% either have or will develop cardiomyopathy,  
46 digestive megasyndromes, or both (Rassi Jr et al. 2010). The disease and its entire cycle  
47 were discovered in 1909 by the Brazilian physician Carlos Chagas (Chagas 1909). *T.*  
48 *cruzi* is transmitted by wound contamination with insect feces during blood sucking;  
49 these bugs are of the subfamily Triatominae, Family Reduviidae (Kollien and Schaub  
50 2000). The insects become infected by ingesting the blood of mammalian hosts infected  
51 with the trypomastigote form of the parasite. Because no vaccine is available,  
52 prevention has relied on vector control and the deterrence of transmission by non-  
53 vectorial mechanisms (Rassi Jr et al. 2010).

54 The life cycle of *T. cruzi* involves distinct morphological stages. In the insect  
55 vector, trypomastigotes transform into replicative epimastigotes. These epimastigotes  
56 then multiply and transform into metacyclic trypomastigotes, which can infect  
57 mammalian cells. Once inside a mammalian host, trypomastigotes differentiate into  
58 amastigotes, which proliferate and then transform again into bloodstream  
59 trypomastigotes. The transformation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes,  
60 (i.e., metacyclogenesis) is a crucial step in the life cycle of *T. cruzi* (De Souza 2002).

61 Platelet-activating factor (PAF), 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-  
62 phosphocholine) is synthesized by a wide variety of cells, including neutrophilic  
63 polymorphonuclear leukocytes, platelets, macrophages and lymphocytes. It is a

1  
2  
3  
4 64 phospholipid that exhibits a large variety of physiological and pathophysiological  
5  
6 65 effects such as cellular differentiation, inflammation, and allergy and acts via specific  
7  
8 66 G-protein-coupled receptors (Honda et al. 2002; Kasperska-Zajac et al. 2008). The  
9  
10 67 physiological role of PAF in lower eukaryotes is still largely unknown. We previously  
11  
12 68 demonstrated that PAF triggers the process of cell differentiation in *Herpetomonas*  
13  
14 69 *muscarum muscarum* (Lopes et al. 1997) and *T. cruzi* (Rodrigues et al. 1996) by  
15  
16 70 modulating ectophosphatase activity in these parasites (Dutra et al. 1998; Rodrigues et  
17  
18 71 al. 1999). PAF also modulates the infection of mouse peritoneal macrophages by  
19  
20 72 *Leishmania amazonensis* via a signaling pathway involving protein kinase C (Rosa et al.  
21  
22 73 2001) and via the activation of two isoforms of protein kinase CK2 in *L. tropica* (Dutra  
23  
24 74 et al. 2009). Moreover, *T. cruzi* epimastigotes synthesize a PAF-like molecule (Gomes  
25  
26 75 et al. 2006).

27  
28  
29  
30  
31 76 In this study, we show that PAF modulates the interaction of *T. cruzi* with  
32  
33 77 *Rhodnius prolixus* and investigate whether the sialyl residues on the parasite surface are  
34  
35 78 required for this interaction.  
36  
37  
38  
39  
40

## 41 80 2. Methods

### 42 43 44 45 82 2.1. Chemicals

46  
47  
48 83 The 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAF) and neuraminidase  
49  
50 84 from *Vibrio cholerae* type III were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO,  
51  
52 85 USA). WEB 2086 (4-[3-[4[(2-Chlorophenyl)-9-methyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,  
53  
54 86 4]triazolo[4,3-a]diazepin-2-yl]-1-oxopropyl]morpholine), a competitive PAF antagonist,  
55  
56 87 was kindly provided by Dr H. Heurer from Boehringer Ingelheim, Germany. All other  
57  
58 88 reagents were of analytical grade.  
59  
60

89

90 2.2. *Trypanosoma cruzi*

91 Epimastigotes of the *T. cruzi* Dm 28C clone were maintained by weekly  
92 transfers in liver infusion tryptone (LIT) medium supplemented with 10% heat-  
93 inactivated fetal bovine serum (FBS) at 28°C (Camargo, 1964). All of the experiments  
94 were performed using parasites harvested by centrifugation and washed three times with  
95 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) before use, unless otherwise specified.

97 2.3. *Rhodnius prolixus*

98 Insects were obtained from Dr. Hatisaburo Masuda's colony (Instituto de  
99 Bioquímica Médica, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil), where they were  
100 maintained in plastic flasks at 28°C and 75% relative humidity. The triatomines were  
101 fed on rabbits every 3 weeks (Folly et al. 2003).

## 103 2.4. PAF and WEB treatment

104 Epimastigotes of *T. cruzi* were incubated with 10<sup>-6</sup> M PAF or 10<sup>-6</sup> M WEB 2086  
105 in LIT medium without supplementation. After 1 h, the parasites were harvested by  
106 centrifugation and washed three times with PBS. For some experiments, the parasites  
107 were treated with 10<sup>-6</sup> M WEB 2086 for 1 h before treatment with 10<sup>-6</sup> M PAF for  
108 another hour.

## 110 2.5. Neuraminidase treatment

111 The parasites were treated with 0.2 U/ml *Vibrio cholerae* type III neuraminidase  
112 in PBS (pH 5.0 with 4 mM CaCl<sub>2</sub>) for 2 h at 37°C and then pretreated or not with 10<sup>-6</sup> M  
113 PAF as described above.

1  
2  
3 114

4  
5 115 *2.6. In vivo interaction*

6  
7  
8 116 Adult females of *R. prolixus* were fed through a silicon membrane feeder  
9  
10 117 containing citrated rabbit blood with  $10^8$  *T. cruzi* epimastigotes/ml (Cabral et al. 2001).  
11  
12 118 The epimastigotes had been pretreated or not with PAF and/or WEB 2086 for 1 h. The  
13  
14 119 midguts of the insects were dissected 11 days after feeding and homogenized with 100  
15  
16 120  $\mu$ l of PBS in a glass Dounce homogenizer on ice. The number of parasites was counted  
17  
18 121 using a Neubauer chamber.  
19  
20  
21

22 122

23  
24 123 *2.7. Ex vivo interaction*

25  
26  
27 124 The midguts of adult females of *R. prolixus* were extracted 11 days after feeding  
28  
29 125 directly on rabbits and individually incubated with  $5 \times 10^6$  *T. cruzi* epimastigotes in 200  
30  
31 126  $\mu$ l of PBS (pH 7.2). After 1 h, the midguts were gently washed three times with PBS  
32  
33 127 and homogenized with 100  $\mu$ l of PBS, and the number of parasites was counted using a  
34  
35 128 Neubauer chamber.  
36  
37

38 129

39  
40  
41 130 *2.8. Measurement of zeta potential*

42  
43 131 Glutaraldehyde-fixed parasites ( $2 \times 10^6$ /ml) were rinsed and resuspended in a  
44  
45 132 solution of  $10^{-2}$  M phosphate-buffered 0.15 M NaCl (pH 7.5) and then poured into the  
46  
47 133 electrophoretic chamber of a cell electrophoresis instrument (Rank Brothers II). The  
48  
49 134 electrophoretic mobilities of at least 40 parasites per assay were recorded using a  
50  
51 135 potential of 100 mV, and the resulting mean values were converted to zeta potentials  
52  
53 136 (Silva-Filho et al. 1987).  
54  
55

56 137

57  
58  
59 138 *2.9. Sialic acid measurement*  
60

1  
2  
3 139 The parasites ( $10^9$  *T. cruzi* epimastigotes) were suspended in 2 ml of water adjusted to  
4  
5 140 pH 2.0 with 50% (vol/vol) formic acid and heated for 1 h at 70°C. The epimastigotes  
6  
7  
8 141 were harvested by centrifugation and the supernatant stored at 4°C. A second hydrolysis  
9  
10 142 of the pellet was performed, resuspending in 2 ml of water adjusted to pH 1.0 with 3 M  
11  
12 143 HCl and heating for 1 h at 80°C; the supernatant was collected by centrifugation (Reuter  
13  
14  
15 144 and Schauer, 2004). Both supernatants were combined and lyophilized, and the amount  
16  
17 145 of sialic acid was assayed colorimetrically (Warren, 1959).  
18  
19  
20 146

#### 21 22 147 2.10. Statistical analysis 23

24  
25 148 All experiments were performed in triplicate. The results are presented as the  
26  
27 149 mean and standard error of the mean (SEM). Normalized data were analyzed by one-  
28  
29 150 way analysis of variance (ANOVA), and differences between groups were assessed  
30  
31 151 using the Student-Newman-Keuls post-test. A *P* value of < 0.05 was considered  
32  
33 152 significant.  
34  
35  
36 153

### 37 38 39 154 3. Results and discussion 40

41 155  
42  
43 156 For the *in vivo* interaction experiments, when the parasites were treated with  
44  
45 157 PAF for 1 h before insect feeding the number of parasites in *R. prolixus* midguts was  
46  
47 158 twofold higher than for the control group (Fig. 1 A). For the *ex vivo* interaction  
48  
49 159 experiments, when the parasites were treated with PAF prior to the interactions, the  
50  
51 160 number of parasites in *R. prolixus* midguts was more than threefold higher than for the  
52  
53 161 control group in which the parasites were not treated (Fig. 1 B). In both cases, treatment  
54  
55 162 with  $10^{-6}$  M WEB 2086 abrogated the effects of PAF (Fig. 1 A and B). In mammalian  
56  
57 163 systems, PAF acts through a membrane receptor to activate a signal transduction  
58  
59  
60

1  
2  
3 164 cascade (Izumi and Shimizu 1995; Edwards and Constantinescu 2009). Little is known,  
4  
5  
6 165 however, about PAF-induced signal transduction in lower eukaryotes. The results of the  
7  
8 166 present study corroborate previously described effects of PAF in trypanosomatids; these  
9  
10 167 effects also seemed to occur through PAF receptors because they were abolished by the  
11  
12 168 PAF antagonist WEB 2086 (Rodrigues et al. 1996; Lopes et al. 1997; Dutra et al. 1998;  
13  
14 169 Rodrigues et al. 1999).

17  
18 170 We measured the surface charge of the parasites by electrophoretic motility in  
19  
20 171 order to investigate the putative mechanism by which PAF could promote an increase in  
21  
22 172 the number of *T. cruzi* parasites found in the midguts of *R. prolixus*. The zeta potential  
23  
24 173 was 35% higher when the parasites were treated with  $10^{-6}$  M PAF for 1 h prior to the  
25  
26 174 assays (Fig. 2 A). The major portion of the net cell surface negativity of all mammalian  
27  
28 175 cells studied is attributed to the sialic acid moieties of surface glycoproteins (Maslow  
29  
30 176 and Harlos 1981). Because the same is true for trypanosomatids (Souto-Pradrón and De  
31  
32 177 Souza 1986; Souto-Pradrón 2002), we decided to determine if the differences in surface  
33  
34 178 charge between PAF-treated and untreated epimastigotes were related to any changes in  
35  
36 179 sialic acid composition. To that end, we performed the same *ex vivo* interaction and  
37  
38 180 electrophoretic motility assays using parasites treated with *Vibrio cholerae* type III  
39  
40 181 neuraminidase. This type of neuraminidase preferentially hydrolyzes  $\alpha$ -(2,3) linkages of  
41  
42 182 sialic acid, although it can also cleave  $\alpha$ -(2,6) and  $\alpha$ -(2,8) linkages (Dungan et al. 2005).  
43  
44 183 Treating the parasites with neuraminidase caused a pronounced reduction in the number  
45  
46 184 of parasites recovered after the *ex vivo* interaction experiments: PAF promoted a  
47  
48 185 threefold enhancement in parasite recovery, while neuraminidase treatment caused a  
49  
50 186 58% reduction in parasite recovery compared to untreated epimastigotes. When the  
51  
52 187 parasites were pretreated with PAF and then incubated with neuraminidase, the number  
53  
54 188 of epimastigotes recovered was 98% lower than that observed for parasites treated only  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 189 with PAF. Thus, neuraminidase completely abrogated the effects of PAF in these  
4  
5 190 experiments (Fig. 2 B). The net surface charge of the epimastigotes was also modulated  
6  
7 191 by neuraminidase. When the epimastigotes were only treated with neuraminidase, their  
8  
9 192 surface charge became less negative; the zeta potential was 9.5 mV in untreated  
10  
11 193 epimastigotes and 5.8 mV in neuraminidase-treated epimastigotes. This enhancement in  
12  
13 194 surface negativity promoted by PAF was inhibited when the parasites were incubated  
14  
15 195 with neuraminidase after the PAF treatment. The zeta potential, which was 12.9 mV in  
16  
17 196 PAF-treated cells (35% more negative than in control epimastigotes), was only 8.5 mV  
18  
19 197 in parasites treated with PAF and neuraminidase (Fig. 2 A). To confirm that this  
20  
21 198 enhancement in parasite surface charge negativity promoted by PAF was related to  
22  
23 199 surface sialic acid, we performed a quantitative chemical assay to measure the amount  
24  
25 200 of sialic acid in PAF-treated vs. untreated parasites (Fig. 3). The PAF-treated  
26  
27 201 epimastigotes showed fourfold higher levels of sialic acid than the untreated  
28  
29 202 epimastigotes.

30  
31  
32  
33  
34  
35  
36 203 Taken together, the present results highly suggest that PAF modulates the  
37  
38 204 surface charge of *T. cruzi* epimastigotes by altering the amount of surface sialic acid.  
39  
40 205 Also, this change could be responsible for the increase in the number of parasites found  
41  
42 206 in the midguts of the insects upon both *in vivo* and *in vitro* interactions. Our data is in  
43  
44 207 agreement with a previous report by Alves and collaborators (2007), which shows that  
45  
46 208 *T. cruzi* attachment to perimicrovillar membrane of *R. prolixus* is prevented by midgut  
47  
48 209 incubation with sialic acid prior to the interaction assays *in vitro*.

49  
50  
51  
52  
53 210 Interestingly, WEB 2086 inhibits the cellular and humoral immune responses  
54  
55 211 induced by *Trypanosoma rangeli* infection in *R. prolixus* hemolymph (Machado et al.  
56  
57 212 2006). In addition, the phagocytosis of yeast cells *in vitro* has been suggested to be  
58  
59 213 related to the activation of PAF receptors in *R. prolixus* hemocytes (Figueiredo et al.  
60

1  
2  
3 214 2008a). Furthermore, Figueiredo and collaborators (2008b) showed that the hemocyte  
4  
5 215 phagocytosis inhibition caused by *T. rangeli* infection *in vivo* is rescued by exogenous  
6  
7  
8 216 arachidonic acid or PAF applied by hemocelic injection.  
9

10 217 Figueiredo and collaborators (2008b) suggested that *T. rangeli* infection *in vivo*  
11  
12 218 depresses eicosanoid pathways and a putative insect PAF analog (iPAF) pathway  
13  
14  
15 219 (Figueiredo et al. 2008b), supporting the role of phospholipase A<sub>2</sub> in the regulation of  
16  
17 220 arachidonic acid and iPAF biosynthesis and the role of PAF acetylhydrolase in reducing  
18  
19 221 the concentration of iPAF in *R. prolixus* hemolymph (Figueiredo et al. 2008b, Castro et  
20  
21 222 al. 2009). Intriguingly, we had previously shown that living *T. rangeli* parasites uptake  
22  
23 223 radioactive lipids from *R. prolixus* lipophorin, which is the main hemolymph lipoprotein  
24  
25 224 of this insect (Folly et al. 2003). In other words, available data suggest that both the  
26  
27 225 insect and the parasite present the means to exchange signaling pathways somehow  
28  
29 226 involving lipid mediators. Accordingly, the saliva of *R. prolixus* is a source of  
30  
31 227 lysophosphatidylcholine (LPC) (Golodne et al. 2003), which enhances *T. cruzi*  
32  
33 228 transmission, and some of its biological effects are attributed to LPC. These data  
34  
35 229 suggest that a vector-derived lysophospholipid may act as an enhancing factor for  
36  
37 230 Chagas disease (Mesquita et al. 2008).  
38  
39  
40  
41  
42

43 231 On the other hand, it is possible that at least some of those findings could be  
44  
45 232 explained by lipid modulators produced by the parasites, rather than the insects.  
46  
47 233 Correspondingly, *T. cruzi*-derived thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) modulates disease  
48  
49 234 pathogenesis in the absence of host-derived TXA<sub>2</sub> (Ashton et al. 2007). These results  
50  
51 235 indicate that TXA<sub>2</sub> controls the proliferation of parasites and resulting inflammatory  
52  
53 236 response to infection by *T. cruzi*. It is worth mentioning that results from our group  
54  
55 237 show that *T. cruzi* synthesizes a PAF-like molecule that modulates *in vitro*  
56  
57 238 differentiation of the parasites from epimastigotes to trypomastigotes, and as a result,  
58  
59  
60



1  
2  
3 239 these parasites are more infectious towards mouse macrophages (Gomes et al. 2006).  
4  
5 240 Further studies should be performed to resolve the roles of lipid modulators in the  
6  
7  
8 241 intricate relationships between trypanosomatids, their insect vectors and mammalian  
9  
10 242 hosts.

11 243

12 244 **Acknowledgements**

13  
14  
15  
16  
17 245 We are thankful to Drs. Felipe A. Dias, Rossiane C. Vommaro, Adriane R.  
18  
19 246 Todeschini, Lucia Mendonça-Previato, Jose O. Previato and David Majerowicz for  
20  
21 247 helpful discussions and to Litiane M. Rodrigues and José de S. L. Junior for technical  
22  
23 248 assistance. The present work was supported by grants from the Brazilian Agencies  
24  
25 249 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação  
26  
27 250 Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and  
28  
29 251 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCTEM). All  
30  
31 252 experiments complied with current Brazilian laws.

32 253

33  
34  
35  
36  
37 254 Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflicts of  
38  
39 255 interest.

40 256

41 257 **References**

42 258

43  
44  
45  
46  
47 259 Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF, Bourguignon  
48  
49 260 SC, de Souza W, Azambuja P, Gonzalez MS (2007) *Trypanosoma cruzi*:  
50  
51 261 Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. Exp  
52  
53 262 Parasitology 116: 44-52

- 1  
2  
3 263 Ashton, AW, Mukherjee S, Nagajyothi F, Huang H, Braunstein VL, Desruisseaux MS,  
4  
5 264 Factor SM, Lopez L, Berman JW, Wittner M, Scherer PE, Capra V, Coffman TM,  
6  
7 265 Serhan CN, Gotlinger K, Wu KK, Weiss LM, Tanowitz, HB (2007) Thromboxane  
8  
9 266 A2 is a key regulator of pathogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp  
10  
11 267 Med 204: 929-940  
12  
13 268 Cabral MO, Azambuja P, Gottlieb OR, Kleffmann T, Garcia ES, Schaub GA (2001)  
14  
15 269 Burchellin: effect on *Triatoma infestans* and on *Trypanosoma cruzi* within this  
16  
17 270 vector. Parasitol Res 87:730-735  
18  
19 271 Camargo EP (1964) Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi* I. Origin of  
20  
21 272 metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop 6: 93-100  
22  
23 273 Carod-Artal FJ, Gascon J (2010) Chagas disease and stroke. Lancet Neurol 9: 533-542  
24  
25 274 Castro DP, Figueiredo MB, Genta FA, Ribeiro IM, Tomassini TCB, Azambuja P,  
26  
27 275 Garcia ES (2009) Physalin B inhibits *Rhodnius prolixus* hemocyte phagocytosis  
28  
29 276 and microaggregation by the activation of endogenous PAF-acetyl hydrolase  
30  
31 277 activities. J Insect Physiol 55: 532–537  
32  
33 278 Chagas C (1909) Nova tripanozomiaze humana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 11-72  
34  
35 279 De Souza W (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm Des 8: 269-  
36  
37 280 285  
38  
39 281 Dugan AS, Eash S, Atwood WJ (2005) An N-Linked Glycoprotein with (2,3)-Linked  
40  
41 282 Sialic Acid Is a Receptor for BK Virus. J Virol 79: 14442-14445  
42  
43 283 Dutra PML, Rodrigues CO, Jesus JB, Lopes, AHCS, Souto-Padrón T, Meyer-Fernandes  
44  
45 284 JR (1998) A novel ecto-phosphatase activity of *Herpetomonas muscarum*  
46  
47 285 *muscarum* inhibited by platelet-activating factor. Biochem Biophys Res Commun  
48  
49 286 253: 164-169  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 287 Dutra PML, Vieira DP, Meyer-Fernandes JR, Silva-Neto MA, Lopes AH (2009)  
4  
5 288 Stimulation of *Leishmania tropica* protein kinase CK2 activities by platelet-activating  
6  
7 289 factor (PAF). Acta Trop 111: 247-254  
8  
9  
10 290 Edwards LJ, Constantinescu CS (2009) Platelet activating factor/platelet  
11  
12 291 activating factor receptor pathway as a potential therapeutic target in autoimmune  
13  
14 292 diseases. Inflamm Allergy Drug Targets 8: 182-190  
15  
16  
17 293 Figueiredo MB, Garcia ES, Azambuja P (2008a) Blockades of phospholipase A2 and  
18  
19 294 platelet-activating factor receptors reduce the hemocyte phagocytosis in *Rhodnius*  
20  
21 295 *prolixus*: In vitro experiments. J Insect Physiol 54: 344–350  
22  
23  
24 296 Figueiredo MB, Genta FA, Garcia ES, Azambuja P (2008b) Lipid mediators and vector  
25  
26 297 infection: *Trypanosoma rangeli* inhibits *Rhodnius prolixus* hemocyte  
27  
28 298 phagocytosis by modulation of phospholipase A2 and PAF-acetylhydrolase  
29  
30 299 activities. J Insect Physiol 54: 1528–1537  
31  
32  
33 300 Folly E, Cunha-Silva NL, Lopes AH, Silva-Neto MA, Atella GC (2003) *Trypanosoma*  
34  
35 301 *rangeli* uptakes the main lipoprotein from the hemolymph of its invertebrate host.  
36  
37 302 Biochem Biophys Res Commun 310: 555-561  
38  
39  
40 303 Golodne DM, Monteiro RQ, Graça-Souza AV, Silva-Neto MAC, Atella GC (2003)  
41  
42 304 Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the  
43  
44 305 blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. J Biol Chem 278: 27766-27771  
45  
46  
47 306 Gomes MT, Monteiro RQ, Grillo LA, Leite-Lopes F, Stroeder H, Ferreira-Pereira A,  
48  
49 307 Alviano CS, Barreto-Bergter E, Neto HC, Cunha E Silva NL, Almeida IC, Soares  
50  
51 308 RM, Lopes AH (2006) Platelet-activating factor-like activity isolated from  
52  
53 309 *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol 36: 165-173  
54  
55  
56 310 Honda Z, Ishii S, Shimizu T (2002) Platelet-activating factor receptor. J Bioch 131:  
57  
58 311 773-779  
59  
60

- 1  
2  
3 312 Izumi T, Shimizu T (1995) Platelet-activating factor: gene expression and signal  
4  
5 313 transduction. *Biochem Biophys Acta* 1259: 317-333  
6  
7  
8 314 Kasperska-Zajac A, Brzoza Z, Rogala B (2008) Platelet-activating factor (PAF): a  
9  
10 315 review of its role in asthma and clinical efficacy of PAF antagonists in the disease  
11  
12 316 therapy. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2: 72-76  
13  
14  
15 317 Kollien AH, Schaub GA (2000) The Development of *Trypanosoma cruzi* in  
16  
17 318 Triatominae. *Parasitol Today* 16: 381-387  
18  
19  
20 319 Lopes AHCS, Dutra PML, Rodrigues CO, Soares MJ, Angluster J, Cordeiro RSB  
21  
22 320 (1997) Effect of platelet-activating factor on the process of cellular differentiation  
23  
24 321 of *Herpetomonas muscarum muscarum*. *J Eukaryot Microbiol* 44: 321-325  
25  
26  
27 322 Machado EMM, Azambuja P, Garcia ES (2006) WEB 2086, a platelet-activating factor  
28  
29 323 antagonist, inhibits prophenoloxidase-activating system and hemocyte  
30  
31 324 microaggregation reactions induced by *Trypanosoma rangeli* infection in  
32  
33 325 *Rhodnius prolixus* hemolymph. *J Insect Physiol* 52: 685–692  
34  
35  
36 326 Maslow DE, Harlos JP (1981) The effect of neuraminidase- and ribonuclease-  
37  
38 327 susceptible surface anionic groups on the aggregation of embryonic chick neural  
39  
40 328 retina cells. *J Cell Sci.* 51: 229-240.  
41  
42  
43 329 Mesquita RD, Carneiro AB, Bafica A, Gazos-Lopes F, Takiya CM, Souto-Padron T,  
44  
45 330 Vieira DP, Ferreira-Pereira A, Almeida IC, Figueiredo RT, Porto BN, Bozza MT,  
46  
47 331 Graça-Souza AV, Lopes AHCS, Atella GC, Silva-Neto MAC (2008)  
48  
49 332 *Trypanosoma cruzi* Infection Is Enhanced by Vector Saliva through  
50  
51 333 Immunosuppressant Mechanisms Mediated by Lysophosphatidylcholine. *Infect*  
52  
53 334 *Immun* 76: 5543-5552  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3 335 Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA (2009) Chagas heart disease: pathophysiologic  
4  
5 336 mechanism, prognostic factors and risk stratification. Mem Inst Oswaldo Cruz.  
6  
7 337 104 (Suppl 1): 152-158  
8  
9  
10 338 Reuter G, Schauer R (1994). Determination of sialic acids. Methods Enzymol. 230: 168-  
11  
12 339 199.  
13  
14  
15 340 Rodrigues CO, Dutra PML, Souto-Pradrón T, Cordeiro RSB, Lopes AHCS (1996) Effect  
16  
17 341 of platelet-activating factor on cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Biochem  
18  
19 342 Biophys Res Commun 223: 735-740  
20  
21  
22 343 Rodrigues CO, Dutra PML, Barros FS, Souto-Pradrón T, Meyer- Fernandes JR, Lopes  
23  
24 344 AHCS (1999) Platelet-activating factor induction of secreted phosphatase activity  
25  
26 345 in *Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun 266: 36-42  
27  
28  
29 346 Rosa MSS, Vieira RB, Pereira AF, Dutra PML, Lopes AHCS (2001) Platelet-Activating  
30  
31 347 Factor (PAF) Modulates Peritoneal Mouse Macrophage Infection by *Leishmania*  
32  
33 348 *amazonensis*. Curr Microbiol 43:33-37  
34  
35  
36 349 Silva-Filho FC, Santos ABS, de Carvalho TM, de Souza W (1987) Surface charge of  
37  
38 350 resident, elicited and activated mouse peritoneal macrophages. J Leukoc Biol 41:  
39  
40 351 143-149  
41  
42  
43 352 Souto-Pradrón T (2002) The surface charge of trypanosomatids. An Acad Bras Cienc 74:  
44  
45 353 649-675  
46  
47  
48 354 Souto-Pradrón T, De Souza W (1986) The surface charge of *Trypanosoma cruzi*:  
49  
50 355 analysis using cell electrophoresis, lectins and ultrastructural cytochemistry. J  
51  
52 356 Submicrosc Cytol. 18:701-709  
53  
54  
55 357 Warren L (1959) The thiobarbituric assay of sialic acids. J Biol Chem 234: 209-215  
56  
57 358  
58  
59  
60

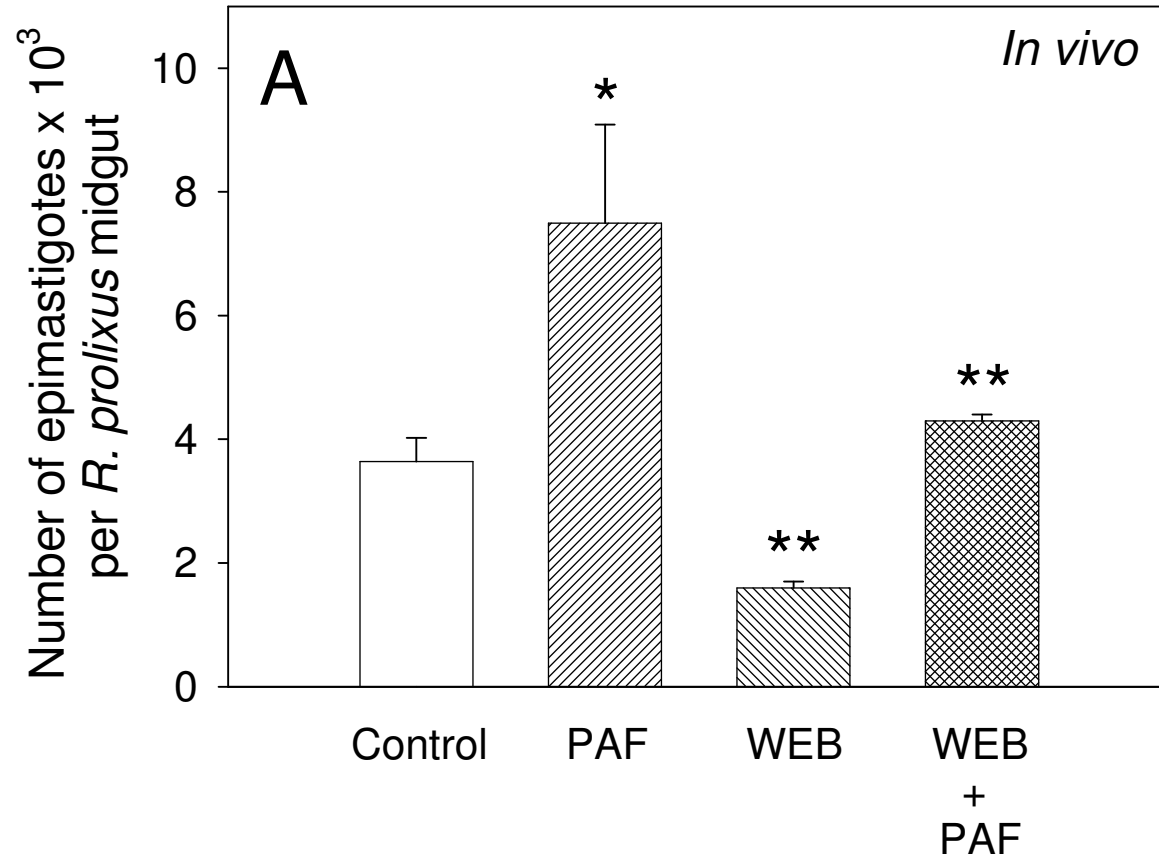
1  
2  
3 359 **Figure legends**  
4  
5  
6 360

7  
8 361 **Figure 1.** Interaction of *Trypanosoma cruzi* (Dm 28c clone) epimastigotes with  
9  
10 362 *Rhodnius prolixus*. (A) *In vivo* interaction. Adult females of *R. prolixus* were fed  
11  
12 363 through a silicon membrane feeder containing citrated rabbit blood with  $10^8$  *T. cruzi*  
13  
14 364 epimastigotes/ml. These parasites had been pretreated or not with  $10^{-6}$  M PAF and/or  
15  
16 365 WEB 2086 for 1 h. The midguts of the insects were extracted 11 days after feeding and  
17  
18 366 homogenized, and the number of parasites was counted. (B) *Ex vivo* interaction. The  
19  
20 367 midguts of adult females *R. prolixus* were extracted 11 days after feeding directly on  
21  
22 368 rabbits and individually incubated with  $10^7$  *T. cruzi* epimastigotes/ml. After 1 h, the  
23  
24 369 midguts were gently washed and homogenized, and the number of parasites was  
25  
26 370 counted. Data are shown as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of at least  
27  
28 371 three independent experiments. One asterisk (\*) indicates that the result was  
29  
30 372 significantly different from the control system, and two asterisks (\*\*) indicate that the  
31  
32 373 result was significantly different from the system in which the parasites were treated  
33  
34 374 with PAF ( $P < 0.05$ , two-tailed ANOVA, Student-Newman-Keuls post-test).  
35  
36 375

37  
38 376 **Figure 2.** Effects of PAF and neuraminidase on surface charge and interactions of  
39  
40 377 *Trypanosoma cruzi* (Dm 28c clone) epimastigotes with *Rhodnius prolixus*. (A)  
41  
42 378 Glutaraldehyde-fixed parasites ( $2 \times 10^6$ /ml) were poured into the electrophoretic  
43  
44 379 chamber of a cell electrophoresis instrument. The electrophoretic mobilities of at least  
45  
46 380 40 parasites per system were recorded under a potential of 100 mV, and the resulting  
47  
48 381 mean values were converted to zeta potentials. (B) The midguts of adult females of *R.*  
49  
50 382 *prolixus* were extracted 11 days after insect feeding directly on rabbits and individually  
51  
52 383 incubated with  $10^7$  *T. cruzi* epimastigotes/ml for 1 h. The parasites had been pretreated  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

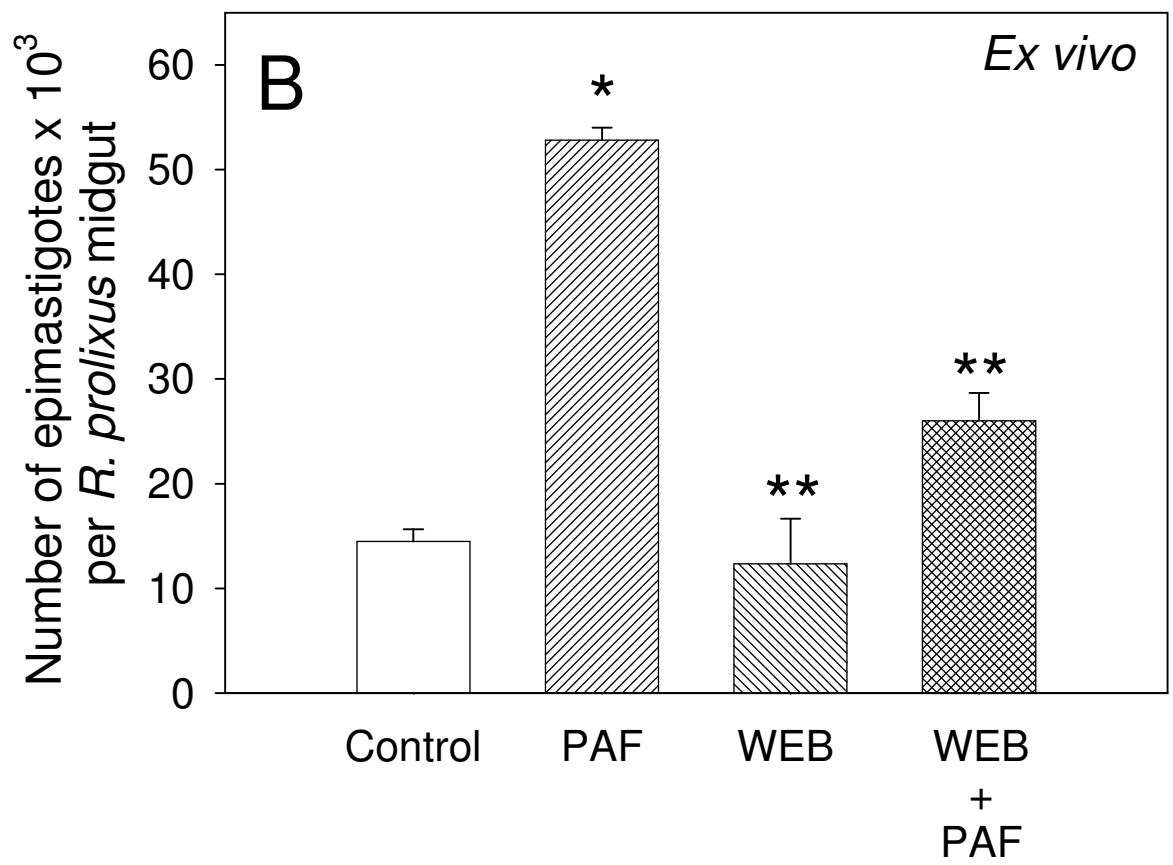
1  
2  
3 384 or not with  $10^{-6}$  M PAF for 1 h and then treated with neuraminidase for 2 h at 37°C. The  
4  
5 385 midguts were gently washed and homogenized, and the number of parasites was  
6  
7 386 counted. Neu = neuraminidase. Data are shown as the mean  $\pm$  standard error of the  
8  
9  
10 387 mean (SEM) of at least three independent experiments. One asterisk (\*) indicates that  
11  
12 388 the result was significantly different from the control system, and two asterisks (\*\*)  
13  
14 389 indicate that the result was significantly different from the system in which the parasites  
15  
16 390 were treated with PAF ( $P < 0.05$ , two-tailed ANOVA, Student-Newman-Keuls post-  
17  
18 391 test).  
19  
20  
21  
22 392

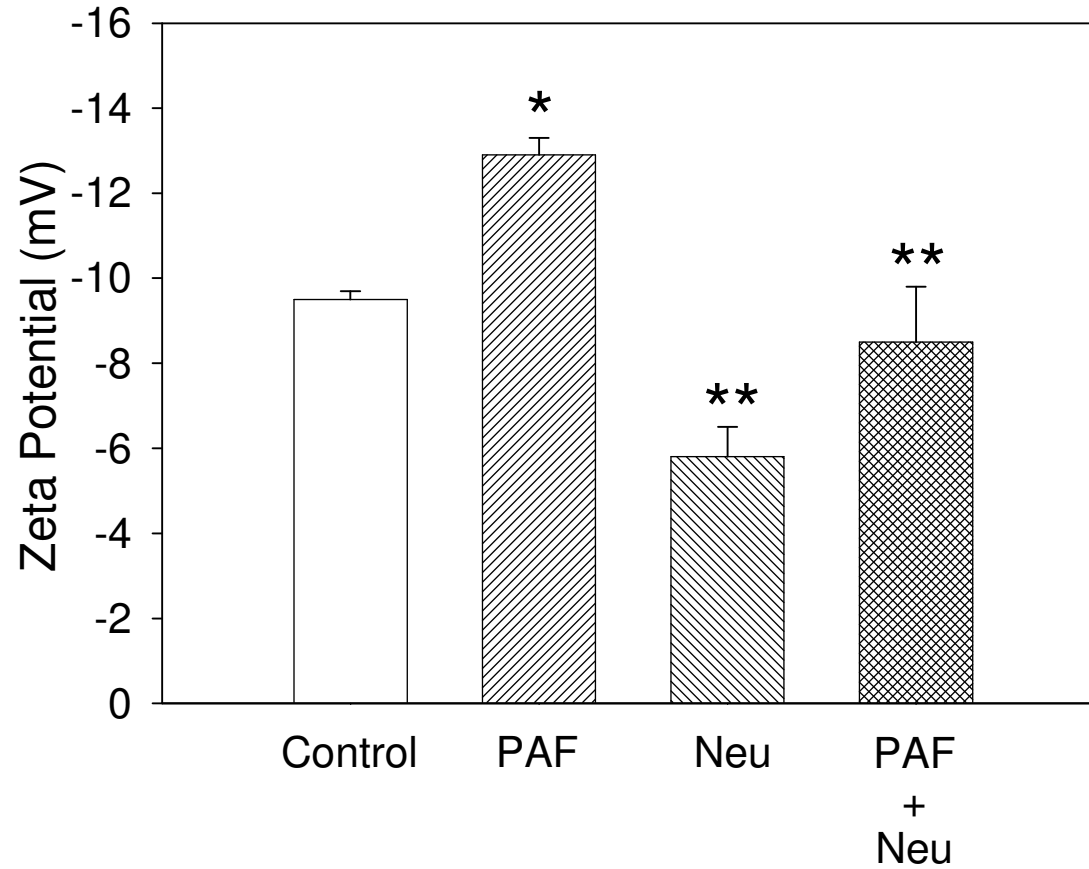
23  
24 393 **Figure 3.** Effects of PAF on the amount of sialic acid on *Trypanosoma cruzi*  
25  
26 394 epimastigotes. The parasites ( $10^9$  *T. cruzi* epimastigotes) were suspended in formic acid  
27  
28 395 (pH 2.0) and heated for 1 h at 70°C. The cells were harvested by centrifugation, and the  
29  
30 396 supernatant was stored at 4°C. A second hydrolysis of the pellet was performed by  
31  
32 397 treatment with treatment with water acidified to pH 1.0 with 3M HCl for 1 h at 80°C,  
33  
34 398 and the supernatant was collected by centrifugation. Both supernatants were combined  
35  
36 399 and lyophilized, and the amount of sialic acid was assayed colorimetrically. The data  
37  
38 400 are shown as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of at least three independent  
39  
40 401 experiments. One asterisk (\*) indicates that the result was significantly different from  
41  
42 402 the control system, and two asterisks (\*\*) indicate that the result was significantly  
43  
44 403 different from the system in which the parasites were treated with PAF ( $P < 0.05$ , two-  
45  
46 404 tailed ANOVA, Student-Newman-Keuls post-test).  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Zimmermann *et al.* 2010: Figure 1 A



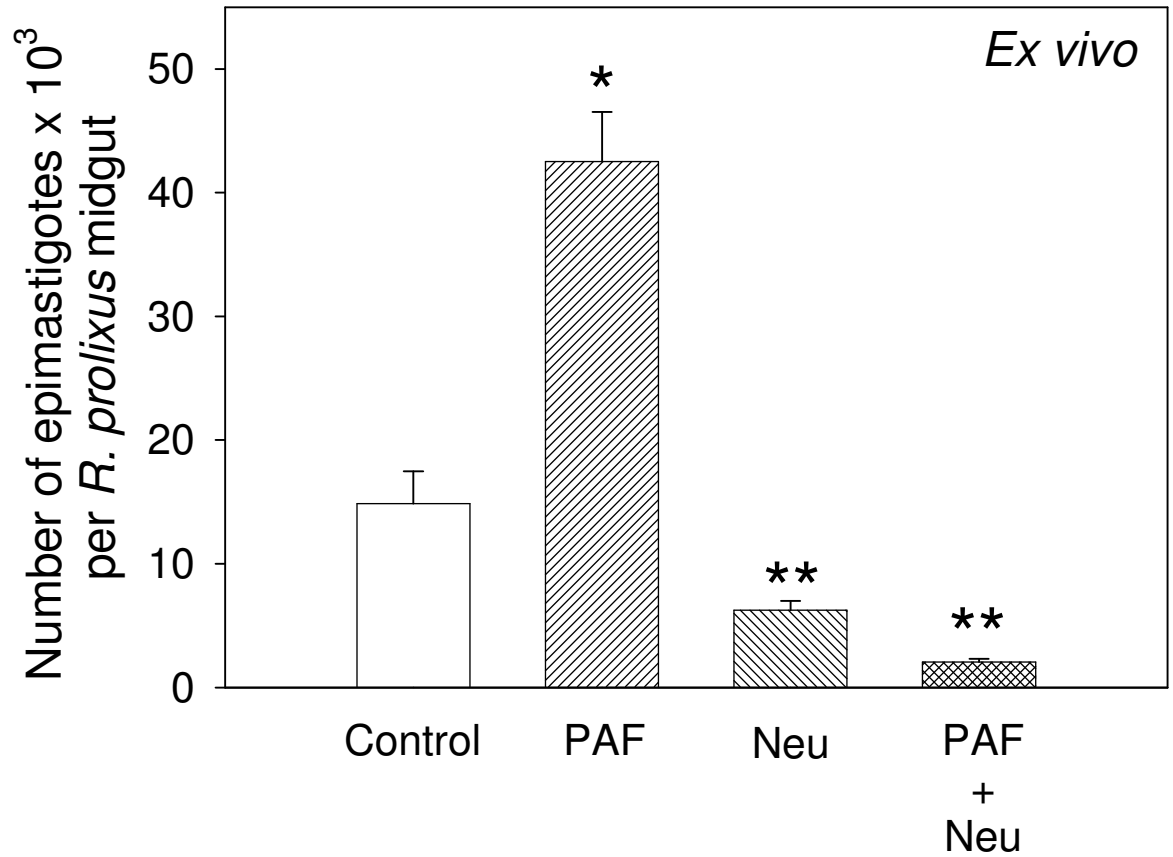
Zimmermann *et al.* 2010: Figure 1 B

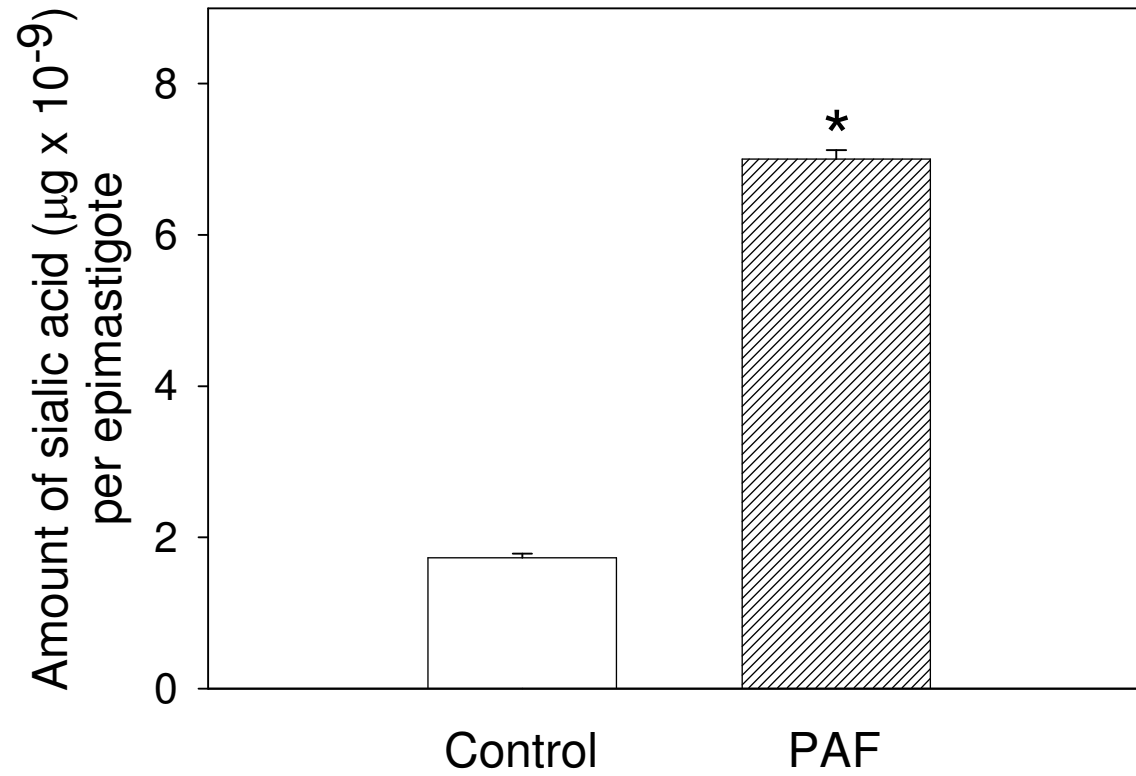


Zimmermann *et al.* 2010: Figure 2 A

Zimmermann *et al.* 2010: Figure 2 B

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49



Zimmermann *et al.* 2010: Figure 3

# 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](#)