



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS



KARINE CANUTO LOUREIRO DE ARAÚJO

INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS ARP2, SEPTINA 4 E 14 NA
INVASÃO E MULTIPLICAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*.

UBERLÂNDIA - MG

2014

KARINE CANUTO LOUREIRO DE ARAÚJO

INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS ARP2, SEPTINA 4 E 14 NA
INVASÃO E MULTIPLICAÇÃO DE *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação apresentada em cumprimento parcial às exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

UBERLÂNDIA - MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A663i
2014

Araújo, Karine Canuto Loureiro, 1988-

Influência das proteínas ARP2, Septina 4 e 14 na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi* / Karine Canuto Loureiro Araújo. -- 2014.

62 f : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Proteínas - Teses. I. Silva, Cláudio Vieira da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas



Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Biologia Celular

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico, Número 021/2014 do PPGBC

Data: 28 de Março 2014

Discente: Karine Canuto Loureiro de Araújo

Matrícula nº. 11212BCE006

Título do Trabalho: "Influência das proteínas Arp 2, Septina 4 e 14 na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi*".

Às quatorze horas do dia vinte e oito de março de 2014 no bloco 8C, sala 8C 103 - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Emanuelle Baldo Gaspar/EMBRAPA-RS; Fernanda Assis Araújo/UFU e Cláudio Vieira da Silva/UFU orientador da candidata. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva apresentou a Comissão Examinadora e a candidata Karine Canuto Loureiro de Araújo, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente ocorreu conforme as normas do Programa. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Concluída a arguição, a qual se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Karine Canuto Loureiro de Araújo aprovada

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17:00h. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Emanuelle Baldo Gaspar
Prof. Dra. Emanuelle Baldo Gaspar
EMBRAPA-RS

Fernanda Assis Araújo
Prof. Dra. Fernanda Assis Araújo
UFU

Cláudio Vieira da Silva
Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva
UFU

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas
Tel: (034)3218-2240, Ramal:28; site www.ppgbc.icbim.ufu.br, e-mail ppgbc@icbim.ufu.br
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama, bloco 2B, sala 2B220, CEP: 38400-902 Uberlândia MG

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor orientador Claudio Vieira da Silva, não tenho palavras para expressar toda a minha gratidão. Obrigada por ter me aceitado em sua equipe, pela admirável orientação, pela confiança, pelos ensinamentos que muito contribuíram para ampliar meu conhecimento e até mesmo pelas críticas e sugestões que me fizeram crescer como aluna.

A toda equipe do Laboratório de Tripanosomatídeos, Ana Flavia, Aline, Bruninha, Flavia, Nubia, Fabi, João Paulo, Celio, Samuel, PC, pelos momentos de descontração e amizade neste período de convivência, em especial Marlus, Amanda, Adele, Thaise e Fabricio que além de amigos, me ajudaram quando precisei de algum auxílio nos experimentos.

À técnica do Laboratório de Microscopia Avançada – Microscópio Confocal da UFU, Mariani Borges Franco pela ajuda da manipulação do microscópio confocal e pela amizade.

Gostaria de agradecer de forma especial à minha família, meus pais, Glycon e Cleide, os maiores exemplos da minha vida, e meus irmãos Thaís e Júnior, por me apoiarem sempre em todos os momentos. Amo vocês!

Ao meu namorado Danilo, por sempre estar do meu lado, me incentivando, apoiando e torcendo pelo meu sucesso. Te amo!

A toda minha grande e querida família tias, tios, primos e primas.

Às minhas grandes amigas Mariana, Ana Luiza e Carla, pela amizade leal e por me trazer a sanidade em alguns momentos. Vocês são muito especiais pra mim!

Ao apoio financeiro das instituições FAPEMIG, CAPES e CNPq.

RESUMO

Trypanosoma cruzi, causador da Doença de Chagas, é um parasito que utiliza múltiplas vias de sinalização na célula para invasão. Uma dessas vias envolve a participação do citoesqueleto de actina na célula hospedeira, que pode ser um importante fator regulador da infecção, que facilita ou impossibilita a disseminação do parasito. Várias proteínas estão associadas neste processo. Sabe-se que a proteína de *T. cruzi* denominada P21 (SILVA *et al.*, 2009) atua ativando uma cascata de sinalização que culmina com a internalização do parasito. Ensaio de invasão com a proteína recombinante P21-His₆ demonstraram que essa proteína induz o processo fagocítico promovendo a polimerização local de actina nas células hospedeiras (RODRIGUES *et al.*, 2012). O presente trabalho teve como objetivo verificar o envolvimento de proteínas na infecção por *T. cruzi*. Com essa finalidade, foram realizados ensaios de invasão e multiplicação do parasito em células *knockdown* para as proteínas Arp2, Septina4 e Septina14. As células também foram tratadas com P21-His₆ para avaliar qual o papel destas proteínas na polimerização de actina. Observou-se que em determinados tempos de invasão ou multiplicação a redução de expressão de Arp2 e das Septinas 4 e 14, possibilitam a progressão da infecção, visto que o número de parasitos em células *knockdown* apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle. Assim, levanta-se a hipótese de que as proteínas analisadas poderiam funcionar como um aparato que impede ou diminui a invasão/multiplicação do parasito. Em ensaios de polimerização de actina, observou-se que as proteínas Arp2 e Septina 14 fazem parte da via ativada pela P21 para induzir tal efeito. Correlacionando todos os resultados obtidos no presente estudo, pode-se questionar sobre uma possível importância das proteínas Arp2 e Septina 14 para o processo de cronificação da Doença de Chagas. De forma geral, os resultados mostram a importância das proteínas aqui estudadas como possíveis alvos de intervenção que controlem ou inibam a infecção por *T. cruzi*.

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma cruzi*. P21. Arp2. Septina 4. Septina 14.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, which causes Chagas Disease, is a parasite that uses multiple signaling pathways in the cell for invasion. One of these pathways involves the participation of the actin cytoskeleton in the host cell, which can be an important regulatory factor in infection, which facilitates or prevents the spread of the parasite. Several proteins are associated in this process. It is known that a protein called P21 *T. cruzi* (Silva et al., 2009) operates by activating a signaling cascade that culminates in the internalization of the parasite. Invasion assays with recombinant His6-P21 protein has shown that this protein induces phagocytic process promoting local actin polymerization in host cells (Rodrigues et al. 2012). This study aimed to verify the involvement of proteins in *T. cruzi* infection. To this end, tests of invasion and multiplication of the parasite in knockdown cells for Arp2, Septina4 and Septina14 proteins were performed. Cells were also treated with P21-His6 to evaluate the role of these proteins in actin polymerization. It was observed that at certain times the significant reduction of invasion or multiplication of Arp2 and Septins 4 and 14, enable the progression of the infection, since the number of parasites in knockdown cells showed a significant increase compared to the control group. Thus arises the hypothesis that the proteins analyzed could function as an apparatus that prevents or decreases the invasion / multiplication of the parasite. In actin polymerization assays, it was observed that the Arp2 septin 14 and part of the protein via the activated P21 to induce such an effect. Correlating all results obtained in this study, a possible importance of Arp2 and septin 14 protein in the process of becoming chronic Chagas disease can be questioned. Overall, the results show the importance of the proteins studied here as possible targets of intervention to control or inhibit infection by *T. cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. P21. Arp2. Septina 4. Septina 14.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário flagelado <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	15
Figura 2: Análise da redução de expressão de proteínas em iMo B6.....	33
Figura 3: Ensaio de invasão de formas amastigotas extracelulares de <i>T. cruzi</i> em iMo B6.. ..	34
Figura 4: Ensaio de invasão de formas amastigotas extracelulares de <i>T. cruzi</i> em mioblastos C2C12.....	34
Figura 5: Ensaio de multiplicação de <i>T. cruzi</i> em iMo B6.	35
Figura 6: Ensaio de multiplicação em iMo B6 48h após infecção	36
Figura 7: Ensaio de multiplicação em iMo B6 72h após infecção	37
Figura 8: Ensaio de multiplicação em iMo B6 96h após infecção	38
Figura 9: Ensaio de multiplicação de <i>T. cruzi</i> em mioblastos C2C12	39
Figura 10: Ensaio de multiplicação em mioblastos C2C12 48h após infecção.....	40
Figura 11: Ensaio de multiplicação em mioblastos C2C12 72h após infecção.....	41
Figura 12: Ensaio de multiplicação em mioblastos C2C12 96h após infecção.....	42
Figura 13: Intensidade média de fluorescência para actina em iMo B6 KD.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
µg	microgramas
µL	microlitros
µm	micrometro
Abs	Absorbância
ADP	adenosina difosfato
AE	amastigotas extracelulares
AMPC	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Arp	<i>Actin related protein</i>
BCA	ácido bicinconínico
BSA	soro albumina bovino
Ca₂⁺	Cálcio
CDC	<i>Cell Division Cycling</i>
CO₂	Dióxido de Carbono
Ctlr	Controle
DAPI	4',6-diamino-2-fenilenoindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DTU	<i>Discete Typing Unit</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	gramas
gp	glicoproteínas de superfícies
GTP	Guanosina trifosfato
h	horas
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Células do Carcinoma Epidermoide de colo de útero
HEPES	hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IgG	Imunoglobulina G
iMo B6	Macrófagos imortalizados de camundongos C57Bl/6
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
KD	<i>knockdown</i>

kDa	kilodalton
L	Litros
LB	Meio Luria-Bertani
LIT	Meio <i>Liver Infusion Tryptose</i>
M	Molar
mg	miligramas
mL	mililitros
mM	milimolar
min	minutos
n°	número
NaCl	Cloreto de Sódio
NaNO₃	Nitrato de Sódio
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	PBS - Tween
PBS-TM	PBS- Tween Molico
PGN	solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% de azida (NaN ₃)
PGN-sap	solução contendo PGN + 0,1% de saponina
pH	potencial hidrogeniônico
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGN	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% de azida (NaN ₃)
PI3	3 fosfatidilinositol
PIP₃	fosfatidilinositol (3,4,5)trifosfato
PPD	parafenilenodiamina
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	rotação por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SEPT	Septina
SFB	soro fetal bovino
shRNA	RNA <i>small hairpin</i>
siRNA	RNA <i>small interference</i>
TBE	tampão Tris-Borato-EDTA
TCT	Tripomastigotas de Cultura de Tecido
TM	Tripomastigotas Metacíclicas

TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i>
UV	Ultra Violeta
Vero	Células de origem epitelial derivadas de rim de Macaco
	Verde Africano
WT	<i>Wild-type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.1.1 Considerações Gerais	13
1.1.2 Ciclo de vida	14
1.1.3 Apresentação clínica da infecção	15
1.1.4 Adesão, Invasão e Multiplicação celular	17
1.2 ENVOLVIMENTO DO CITOESQUELETO DE ACTINA NA INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i>	20
1.2.1 Septinas	21
1.2.2 Arp 2	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 LINHAGENS DE CÉLULAS	26
4.2 PARASITOS	26
4.3 TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS COM PARTÍCULAS DE LENTIVIRUS PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i>	27
4.4 ENSAIO DE INVASÃO	28
4.5 ENSAIO DE MULTIPLICAÇÃO	28
4.6 TRATAMENTO DE CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> COM P21-His ₆	29
4.6.1 Obtenção de P21-His ₆	29
4.6.2 Citometria de fluxo	30
4.7 NORMAS DE BIOSSEGURANÇA	30
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5 RESULTADOS	32

5.1 CONFIRMAÇÃO DA REDUÇÃO DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ARP2, SEPTINA 4 E 14 NAS CÉLULAS	32
5.2 INTERFERÊNCIA NA INVASÃO DE <i>T. cruzi</i> EM MACRÓFAGOS E MIOBLASTOS <i>KNOCKDOWN</i>	32
5.3 INTERFERÊNCIA NA MULTIPLICAÇÃO DE <i>T. cruzi</i> EM MACRÓFAGOS E MIOBLASTOS <i>KNOCKDOWN</i>	35
5.4 EFEITO DO TRATAMENTO DE CÉLULAS <i>KNOCKDOWN</i> COM P21-His ₆	43
6 DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1.INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Considerações Gerais

A doença de Chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado que pertence à ordem Kinetoplastida, que é caracterizada pela presença de DNA circular extranuclear que corresponde ao DNA mitocondrial (ARAÚJO, JANSEN, FERREIRA, 2009; REY, 2011; PEREIRA e NAVARRO e, 2013). Anos atrás, a doença de Chagas era restrita somente à América Latina, mas se disseminou para América do Norte e Europa. Assim, estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo mundo (WHO, 2012; MANDACARU, 2013), sendo que cerca de 40 mil novos casos são diagnosticados anualmente na América Latina, com 12 mil óbitos anuais diretamente relacionados à doença (WHO, 2011). De acordo com Petherick (2010), no Brasil há pelo menos três milhões de infectados, sendo que a maior parte das pessoas infectadas apresenta-se na fase crônica da doença e muitos se apresentam na forma indeterminada (sem sintomas).

A complexa cadeia de fatores que promove a circulação de *T. cruzi* na natureza inclui cerca de 40 espécies de insetos-vetores (Hemiptera:Reduviidae) e 180 espécies de mamíferos sabidamente permissivos às infecções pelo protozoário flagelado (DIOTAIUTI, 2009; NOIREAU; DIOSQUE; JANSEM, 2009). Mas acredita-se que até 1150 espécies de mamíferos possam fazer parte dessa cadeia (PATTERSON, 1994).

Estima-se que a via de transmissão da Doença de Chagas tenha sido iniciada há cerca de 90 milhões de anos, quando os elementos que sustentam a cadeia de transmissão já estavam estabelecidos nos ecossistemas terrestres (TEIXEIRA *et al.*, 2006). No início, as infecções por *T. cruzi* teriam sido adquiridas pela via oral quando mamíferos onívoros ingeriam triatomíneos contaminados com o parasito, mas à medida que muitos mamíferos tornaram-se infectados, sua transmissão pelos insetos hematófagos passou a ter papel preponderante na propagação da antroponose (DIOTAIUTI, 2009). Além da transmissão clássica da doença que ocorre por meio do contato da pele lesionada com tripomastigotas metacíclicos presentes em excretas de

insetos vetores contaminados, a doença pode ser veiculada em transplantes de órgãos, por transfusão sanguínea, de forma congênita e por via oral (WHO, 2010).

Até a década de 1980, as cepas de *T. cruzi* foram subdivididas em três grupos (zimodemas), baseadas na utilização da diferenciação dos perfis eletroforéticos de isoenzimas, denominados Z1, Z2 e Z3. Estudos epidemiológicos mostraram que Z1 e Z3 estão associados às cepas que circulam no ciclo silvestre e Z2 àquelas que circulam no ciclo de transmissão doméstico (MILES *et al.* 1978). Com os avanços nas técnicas de biologia molecular, pode-se dizer que o parasito apresenta uma grande diversidade genética e, portanto, pode ser classificado em seis grupos determinados DTU (“*Discrete Typing Unit*”), que é um conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares comuns (TIBAYRENC, 1998). Estes grupos foram designados *T. cruzi* I a VI (ZINGALES *et al.*, 2009). Sendo a cepa G, utilizada neste trabalho, pertencente a *T. cruzi* I.

1.1.2 Ciclo de vida

T. cruzi é um parasito heteroxênico, cujo ciclo de vida envolve a passagem em um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado (mamífero). Os hospedeiros invertebrados são insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, popularmente conhecidos como barbeiros (SHERLOCK, 2000). O ciclo de vida no hospedeiro invertebrado inicia-se com a picada pelo inseto vetor em um mamífero infectado ingerindo, assim, formas tripomastigotas sanguíneas. No estômago do inseto, essas formas diferenciam-se em epimastigotas que migram ao longo do trato digestório. No intestino, os epimastigotas se multiplicam e podem migrar e aderir às porções posteriores, cujo ambiente é pobre em nutrientes (KOLLIEN e SCHAU, 2000; HERNANDEZ OSORIO *et al.*, 2010), diferenciando-se novamente em tripomastigota metacíclico, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Essas formas diferenciadas no intestino posterior são eliminadas nas fezes e urina do inseto. No hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos penetram na corrente sanguínea através de mucosas ou de ferimentos na epiderme. Estas formas são capazes de infectar células de diferentes tecidos onde se diferenciam em formas amastigotas intracelulares. Após sucessivas divisões no citoplasma da célula, as formas amastigotas se transformam em formas tripomastigotas (CARVALHO e DE SOUZA, 1989; ANDREWS *et al.*, 1990, DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Ocorre

então a ruptura da célula com liberação dos parasitos, que podem ou infectar outras células ou ser ingeridos pelo inseto vetor, fechando o ciclo (DE SOUZA, 1984). A capacidade de formas amastigotas de invadir células e apresentar infectividade *in vivo* constitui um modo alternativo de propagação do ciclo do parasito o que contribui para sobrevivência do mesmo no hospedeiro vertebrado (REGO, 1956; BURLEIGH e ANDREWS, 1995, MORTARA *et al.*, 2005) (Figura 1).

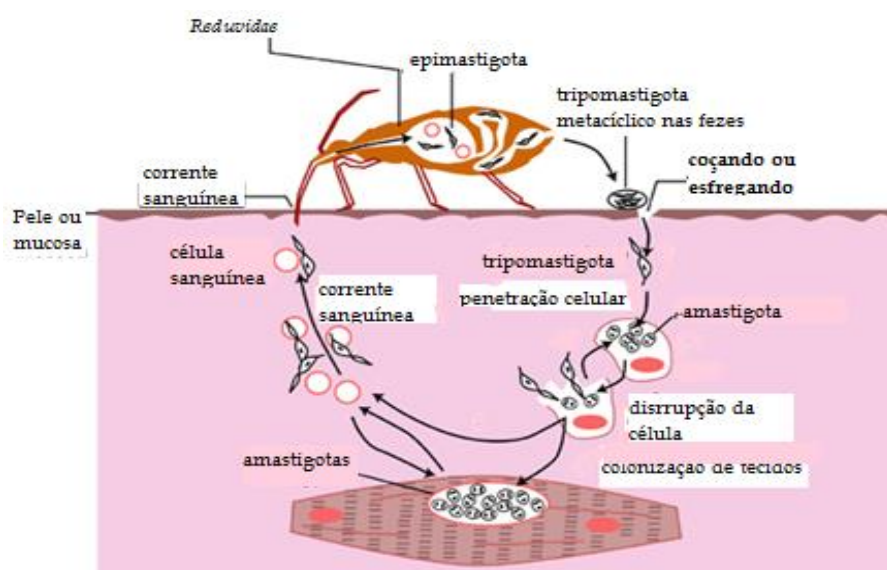


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. (Fonte: figura adaptada de Expert Reviews in Molecular Medicine, 2002).

As formas evolutivas do parasito são classificadas de acordo com as mudanças morfológicas que ocorrem no ciclo, especificamente com a posição do seu cinetoplasto. Os tripomastigotas possuem seu cinetoplasto posterior ao núcleo, são alongados e possuem uma membrana que emerge de sua extremidade posterior. As formas amastigotas são arredondadas ou ovóides e apresenta flagelo bem curto que praticamente não se exterioriza para fora da bolsa flagelar, o cinetoplasto se apresenta em forma de bastão anterior ao núcleo e são as formas replicativas no hospedeiro vertebrado. Os epimastigotas possuem seu cinetoplasto posicionado anterior ao núcleo e são as formas replicativas no hospedeiro invertebrado (SOUZA, 1999).

1.1.3 Apresentação clínica da infecção

A doença de Chagas pode ser classificada em fase aguda ou crônica, de acordo com o tempo de infecção e resposta do hospedeiro. Na fase aguda, a doença apresenta características clínicas variáveis e de gravidade variável. O diagnóstico é feito pela presença de sinais clínicos da doença como sinal de Romana e chagoma cutâneo, sendo comprovado pela presença do parasito no sangue periférico. Já a fase crônica é caracterizada pela baixa parasitemia e alta quantidade de anticorpos circulantes, em que as manifestações clínicas são consequências do parasitismo intracelular. É classificada em forma cardíaca, digestiva ou mista (FIOCRUZ, 2012). Do número total de pessoas infectadas, até 30% evoluem para a forma crônica da doença com alterações cardíacas, 10% com alterações digestivas, além de possíveis alterações neurológicas (WHO, 2012).

A manifestação cardíaca pode ser considerada como a mais importante na doença de Chagas devido às suas características, frequência e consequências (TANOWITZ *et al.*, 1992). Essa forma apresenta gravidade variável, desde alterações eletrocardiográficas sutis, até insuficiência cardíaca ou morte súbita, batimentos cardíacos fora de ritmo (extrassístoles e arritmias), angina, falta de ar a esforços físicos e insuficiência cardíaca progressiva. De forma geral, quando há insuficiência cardíaca, o coração apresenta-se hipertrofiado, com dilatação em todas as câmaras. Neste caso, a inflamação assume caráter difuso, estendendo-se a diversas áreas, não mais dependendo da presença do parasito, mas sim da participação de diversos fatores imunológicos (RASSI JUNIOR *et al.* 2009). Já os pacientes que apresentam a forma indeterminada não apresentam os sintomas característicos da doença de Chagas, mas a infecção pode ser demonstrada por da sorologia positiva ou pela detecção do parasito por PCR, hemocultura ou xenodiagnóstico. (PRATA, 2001, VAGO *et al.* 2000).

Acredita-se que as manifestações patológicas, tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da doença sejam consequências de mecanismos multifatoriais relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado. Dentre os fatores relacionados ao parasito, análises em camundongos revelaram que a variabilidade das cepas, o tropismo, a antigenicidade e o tamanho do inóculo são aspectos relevantes (ANDRADE, 2000). Quanto ao hospedeiro, é importante ressaltar a faixa etária, o estado nutricional e, especialmente, as características imunológicas (DIAS, 2000).

Existem dois medicamentos comercializados que atuam efetivamente na fase aguda da doença (Benzonidazol & Nifurtimox), mas o mesmo efeito não é proporcional na fase crônica. Além disso, os danos colaterais dessas drogas são intensos e

responsáveis pela interrupção do tratamento por muitos pacientes (PEREIRA e NAVARRO, 2013). Esses medicamentos foram introduzidos na clínica como potente tripanocida nas décadas de 1960 e 1970, porém, há divergências quanto aos percentuais de cura e, por outro lado, há consenso sobre a sua utilidade, a depender de circunstâncias como: transmissão congênita, fase da doença, idade do paciente e condições associadas (DIAS, AMATO, LUNA, 2011; ALVES *et al.*, 2012). Portanto, é importante a pesquisa de elementos que possam agir interferindo na atividade de tripanossomatídeos.

1.1.4 Adesão, Invasão e Multiplicação celular

A identificação de moléculas envolvidas nas múltiplas interações de *T. cruzi* com células hospedeiras, assim como as suas vias de sinalização, é fundamental para a compreensão da infecção de mamíferos pelo parasito (MATTOS *et al.*, 2012). O estabelecimento da infecção depende de uma série de eventos envolvendo interações de diversas moléculas do parasito com componentes do hospedeiro (MAYA *et al.*, 2006). Produtos secretados por células desempenham papéis biológicos fundamentais, que representa a interface primária entre o parasito e o hospedeiro. Os componentes incluem proteínas envolvidas em processos biológicos como a migração celular, adesão celular, comunicação célula-célula, a proliferação, a diferenciação, a morfogênese e a regulação das respostas imunes (VALLEJO *et al.*, 2012). Várias células podem ser alvo de invasão, dentre elas macrófagos, células epiteliais, neuronais e musculares (CESTARI, 2006).

A invasão de células de mamíferos por *T. cruzi* tem sido exaustivamente estudada *in vitro* por meio do uso de tipomastigotas metacíclicos, tripomastigotas de cultura de tecidos e amastigotas diferenciados extracelularmente (DOCAMPO *et al.*, 1995; YOSHIDA, 2003, RODRIGUES *et al.*, 2012). Diferentes cepas de *T. cruzi* e uma variedade de tipos celulares, principalmente aquelas que exercem função fagocitária tem sido usadas. A penetração e interiorização do parasito envolvem múltiplos fatores (DOCAMPO *et al.*, 1995; YOSHIDA, 2003) que interagem com as células do hospedeiro. Desses fazem parte, moléculas de superfície do parasito, tais como mucinas, transialidases, polissacarídeos, glicoproteínas e lipídios ancorados ao fosfatidilinositol na membrana, proteína P21, (SILVA *et al.*, 2009, VILLALTA *et al.*, 2008) e algumas proteases como cruzipana secretadas por formas epimastigotas (CAZZULO *et al.*, 1990),

oligopeptidase B secretadas por formas tripomastigotas (BURLEIGH e ANDREWS, 1995), Tc80, um membro da família de protease serina, que hidrolisa os tipos de colagénio humano I e IV a pH neutro e também a fibronectina, que é importante para o trânsito do parasita através da matriz extracelular (SANTANA *et al.*, 1997; GRELLIER, VENDEVILLE, VENDEVILLE, 2001).

A fase do reconhecimento celular envolve uma etapa inicial de adesão do parasita à célula hospedeira seguida de sua internalização sempre dentro de um vacúolo fagocítico. A fusão fago-lisosomal foi observada para todos os três estágios evolutivos do parasita (NOGUEIRA e COHN, 1976, MEIRELLES *et al.*, 1996). A invasão por cepas distintas de *T. cruzi* nas células depende de diferentes glicoproteínas de superfície (gp), ou seja, para cada cepa há uma gp específica que induz maiores níveis de invasão (CORTEZ *et al.*, 2006; COVARRUBIAS *et al.*, 2007; YOSHIDA *et al.*, 2006; YOSHIDA *et al.*, 2008). Para invadir as células, tripomastigotas metacíclicos utilizam as glicoproteínas de superfície, tais como gp82, gp35/50, ou gp30, uma variante da gp82 expressa em isolados deficientes de gp82, mucinas e trans-sialidases (YOSHIDA e CORTEZ, 2008; (DE PABLOS, GONZALEZ *et al.*, 2011; BUSCAGLIA, CAMPO *et al.*, 2006). A gp82 e a gp35/50 desencadeiam a cascata de sinalização, que leva à mobilização de Ca_2^+ intracelular, tanto no parasito quanto na célula alvo (RUIZ *et al.*, 1998). A elevação de Ca_2^+ citosólico promove associações dos eventos que facilitam a invasão: remodelamento do citoesqueleto de actina e recrutamento de lisossomos que culminam na exocitose dos mesmos (CORTEZ, ATAYDE, YOSHIDA, 2006; MARTINS *et al.*, 2011, MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012). Tripomastigotas metacíclicos da cepa G parecem utilizar preferencialmente as gp35/50 para interagir com as células (YOSHIDA *et al.*, 1989). Essas moléculas são do tipo mucina, e são expressas em formas metacíclicas e em epimastigotas de todas as cepas de *T. cruzi* examinadas (YOSHIDA, 2006), que aparentemente medeiam a invasão pelo recrutamento de filamentos de actina, um evento que pode estar associado com ativação de adenilil ciclase, que gera AMPc (FERREIRA *et al.*, 2006; MAEDA; CORTEZ; YOSHIDA, 2012). Mucinas são glicoproteínas que têm uma densa matriz de oligossacarídeos O-ligados, as quais recobrem superfícies de muitos protozoários parasitos, que cumprem uma dupla finalidade: fornecer mecanismos de defesa derivados do hospedeiro vertebrado e garantir o direcionamento e invasão de células ou tecidos específicos (HOLLINGSWORTH e SWANSON, 2004).

No que se refere a P21 (SILVA *et al.*, 2009), que é uma proteína secretada na justaposição parasito-célula hospedeira, sabe-se que é responsável por ativar uma cascata de sinalização que culmina com a internalização do parasito. Silva e colaboradores (2009) caracterizaram, a partir de triagem em base de dados do genoma de *T. cruzi*, uma proteína ubíquota ao parasito de peso molecular 21 kDa denominada P21, que é secretada por todas as formas evolutivas do parasito e desempenha papel importante durante a invasão de células fagocíticas e não fagocíticas por tripomastigotas e amastigotas extracelulares.

Para estudar, caracterizar e descobrir as funções biológicas dessa proteína Silva e colaboradores (2009) clonaram genes da proteína nativa, inserindo-o no vetor pET28a(+), transformando a bactéria *E. coli*, de modo que expressasse a proteína em quantidades satisfatórias para efetuar estudos biológicos, resultando na elaboração de um protocolo que descreve o método de purificação da proteína recombinante a partir dos corpos de inclusão do extrato bacteriano, o “Protocolo de purificação e renovelamento da P21-His₆”. Posteriormente, Santos *et al.* (2014) demonstraram que a utilização do protocolo descrito de purificação e renovelamento da P21- His₆, que foi purificada a partir dos corpos de inclusão do lisado bacteriano biologicamente ativo, é um método seguro e que mantém a conformação correta da proteína.

Ensaio de invasão com a proteína recombinante P21-His₆ foram realizados e demonstrou-se que esta proteína induz o processo fagocítico ativando a via de sinalização celular de PI3-quinase na célula hospedeira, sendo que, uma vez ativa ocorre a fosforilação de fosfolipídios, os quais atuam em proteínas associadas a actina, promovendo sua polimerização local nas células. A P21-His₆ pode ser ainda, um importante fator de evasão a resposta imune do hospedeiro por *T. cruzi*. Sua atividade pró-fagocítica pode permitir a permanência do parasito na célula hospedeira podendo participar de alguma forma no processo de cronificação da Doença de Chagas (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Ainda em relação a P21-His₆, Martins (2013) verificou em seus estudos que o tratamento de mioblastos com essa proteína diminuiu significativamente a multiplicação de *T. cruzi* dentro das células e aumentou a polimerização de actina, e observou também que após ser endocitada, a proteína é parcialmente degradada na célula dentro das vesículas lisossomais e é possivelmente exocitada depois de 48 h.

1.2 ENVOLVIMENTO DO CITOESQUELETO DE ACTINA NA INFECÇÃO POR *T. cruzi*

O citoplasma de células eucarióticas contém uma elaborada rede de proteínas filamentosas – o citoesqueleto – que compreende três polímeros distintos, mas integrados: microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários. Como sugerido pelo próprio nome, o papel do citoesqueleto é, em parte, promover um suporte estrutural na célula, determinando o tamanho, forma e propriedades mecânicas da célula. No entanto, o citoesqueleto não é estático, ele pode ser rapidamente remodelado para encontrar novas necessidades celulares em resposta a programas homeostáticos intrínsecos assim como mudanças ambientais (KIM e COULOMBE, 2010).

Observou-se que a dinâmica do citoesqueleto da célula hospedeira para o processo de invasão é diferente para cada forma evolutiva do parasito, sendo que em formas tripomastigotas metacíclicas, que são tradicionalmente infectivas, há uma formação de protrusões ricas em actina ao redor do parasito (SCHENKMAN e MORTARA, 1992, RODRIGUES *et al.*, 2012). Já as formas amastigotas extracelulares induzem formação de agregados de filamentos de actina no local de adesão bem como de estruturas semelhantes a crateras ou taças, dependendo do tipo de célula, com a subsequente internalização do parasito. Este processo depende então, da integridade do citoesqueleto de actina, ao contrário do que ocorre com as formas tripomastigotas (MORTARA, 1991; PROCÓPIO *et al.*, 1998).

Enquanto as células estão sendo invadidas por *T. cruzi*, ocorrem alterações na célula hospedeira, que inclui um aumento nos níveis de cálcio citosólico causado por sua liberação a partir dos depósitos intracelulares (OSUNA *et al.*, 1986; RODRIGUEZ *et al.*, 1996), seguido da despolimerização dos filamentos de actina e do recrutamento de lisossomos na direção da membrana plasmática por um processo dependente de cinesina, que resulta na participação do citoesqueleto da célula hospedeira na invasão pelo parasito (OSUNA *et al.*, 1986; RODRIGUEZ, *et al.*, 1996; VILLALTA *et al.*, 2001). Estudos realizados com patógenos intracelulares mostraram que os mesmos subvertem o citoesqueleto da célula hospedeira para promover a sua própria sobrevivência, replicação e disseminação. Pesquisas como essas levaram a muitas descobertas sobre a biologia da célula hospedeira, incluindo a identificação de proteínas do citoesqueleto, vias de regulação e mecanismos de função do citoesqueleto. A actina é um alvo comum de bactérias patogênicas (HAGLUND e WELCH, 2011), por isso é

importante o estudo de moléculas, tal como Arp2, que possam interferir na dinâmica do citoesqueleto, mas trabalhos recentes também destacam o envolvimento dos microtúbulos do citoesqueleto, filamentos intermediários e de proteínas como as septinas (HAGLUND e WELCH, 2011).

1.2.1 Septinas

A descoberta das septinas (SEPT) ocorreu quando Hartwell em 1971 percebeu que *Saccharomyces cerevisiae* que eram sensíveis à temperatura apresentavam mutações que afetavam uma proteína. Essas leveduras apresentavam como fenótipo problemas no processo de divisão celular, verificou-se que as células filhas não se separavam das células mãe. Os estudos de microscopia eletrônica mostraram que a formação do septo que separa célula mãe e filha no brotamento em leveduras não mais ocorria do modo correto, desta forma as proteínas formadoras do septo de divisão receberam o nome de septinas. A alteração do fenótipo nessas leveduras estava envolvida com mutações nos genes CDC (*Cell Division Cycling*) do tipo 3, 10, 11 ou 12 que foram as primeiras septinas identificadas (HARTWELL, 1971).

Em suas características estruturais, septinas são uma família de proteínas ligantes a GTP, mais precisamente P-loop GTPases, (PAN *et al.*, 2007), ou seja, podem hidrolisar nucleotídeos de guanina. Já foram encontradas em nematódeos, moscas, fungos, protozoários e animais, mas nunca em plantas (KINOSHITA *et al.*, 1997; SHINODA *et al.*, 2010). À medida que septinas foram sendo purificadas de fontes nativas tais como *S. cerevisiae*, *Drosophila* e humanos observou-se que eram sempre formadas por heterofilamentos (KINOSHITA, 2003). Elas desempenham as suas funções por meio do recrutamento de um enorme conjunto de outras proteínas. Vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de compreender as interações proteicas estabelecidas entre estas proteínas e com outras proteínas. Sabe-se, porém que existem diversos complexos proteicos envolvendo as septinas em processos fundamentais ao funcionamento da célula. De fato, vários estudos relativos a sua funcionalidade tem sido desenvolvidos, identificando o seu envolvimento em fenômenos cruciais à divisão e manutenção da integridade celular, entre as quais, a determinação da polaridade (FATY *et al.*, 2002).

Septinas também são altamente expressas em células com baixas taxas de divisão celular. Em neurônios, por exemplo, elas estão envolvidas em exocitose e

tráfego de vesículas. *In vivo*, sabe-se que septinas interagem tanto com o citoesqueleto, quanto com a membrana plasmática e essas interações nos indicam duas possíveis funções ainda não bem entendidas. Essas proteínas funcionam como arcabouços que recrutam e ancoram proteínas ou estruturas celulares e barreiras que segregam diferentes regiões celulares (KINOSHITA, 2003; WEIRICH *et al.*, 2008).

Alguns estudos mostraram que septinas podem contribuir para a invasão celular por bactérias. No caso de bactérias, como *Listeria* e *Shigella*, observou-se que a depleção de septina-2 nas células reduzia a eficiência de invasão desses patógenos, e também o número de outras septinas que se localizam em torno de bactérias invasoras (MOSTOWY *et al.*, 2009). Esse estudo com *Listeria* mostrou que o efeito causado por essa depleção é específico para uma via e varia de célula para célula, sugerindo que as septinas participam do processo de invasão por vias distintas (HAGLUND e WELCH, 2011).

Na espécie humana foram identificados, até hoje, 14 genes pertencentes à família das septinas (SEPT). A nomenclatura destes genes e proteínas foi uniformizada recentemente por Macara e colaboradores, designando-se por *SEPT1* a *SEPT14* e SEPT1 a SEPT14 (MACARA *et al.*, 2002).

A SEPT4 foi relacionada a diversos processos celulares tais como divisão celular, transporte de vesículas, apoptose e supressão de tumores (TANAKA *et al.*, 2001; HALL e RUSSELL, 2004), e é altamente expressa no sistema nervoso central (HALL *et al.*, 2005), sendo também detectada sua expressão no coração, fígado, células endoteliais e em menor escala em outros tecidos (ZIEGER *et al.*, 2000). Embora vários membros da família de septina, incluindo SEPT14, são abundantemente expressos em tecidos do sistema nervoso, pouco se sabe sobre as suas funções fisiológicas, principalmente no desenvolvimento neuronal. Em uma pesquisa realizada por Shinoda *et al.* observou-se que a SEPT 14 é fortemente expressa no córtex cerebral em desenvolvimento (SHINODA *et al.*, 2010).

1.2.2 Arp 2

Células de plantas, fungos e animais utilizam-se do rearranjo dos filamentos de actina para se mover e remodelar-se (POLLARD e COOPER, 2009; DOOLITTLE, ROSEN, PADRICK; 2013). Estas células constroem filamentos de actina que controlam sua forma e organização interna e o primeiro passo na montagem de uma destas redes é

a nucleação de novos filamentos de actina. Alguns estudos identificaram múltiplos fatores celulares capazes de construí-los (BAUM e KUNDA, 2005; GOLEY e WELCH, 2006; KOVAR, 2006; AKIN e MULLINS, 2008). Cada um destes fatores parece ser especializado para construção de um tipo particular de rede, sendo que o mais bem estudado deles é o fator de nucleação, denominado complexo Arp 2/3 (*actin related protein 2/3*), que inicia a montagem de novos filamentos a partir de pré-existentes para gerar matrizes de redes de filamentos ramificados (MULLINS, HEUSER, POLLARD, 1998; AKIN e MULLINS, 2008).

A maioria dos patógenos invasores sinalizam para o complexo Arp 2/3 durante a invasão. Estudos demonstraram a importância do complexo Arp 2/3, que ao ser ativo por fatores promotores de nucleação promove a nucleação de filamentos de actina, resultando no remodelamento da membrana plasmática e consequentemente na invasão de bactérias (HAYWARD e KORONAKIS, 1999; ZHOU, MOOSEKER, GALÁN, 1999; HÄNISCH *et al.*, 2011).

O complexo Arp 2/3, é um complexo de proteína de sete subunidades que inclui as proteínas relacionadas com a actina Arp2 e Arp3 e cinco proteínas acessórias compostas por Arp2, Arp3, ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 e ARPC5. É um elemento chave para formação de redes de filamentos de actina (actina F) na maioria das células eucariotas (INSALL e MACHESKY, 2009; CHOI *et al.*, 2013; HIGGS, 2001; POLLARD, BELTZNER, 2002; PETCHAMPAI *et al.*, 2014). O complexo nucleia um novo filamento de actina a partir do local de um filamento existente. ARPC1-5, Arp2 e Arp3 são proteínas relacionadas com a actina que se submetem à mudança conformacional e se ligam ATP. Arp2 e Arp3, combinada com a hidrólise de ATP, são necessários para remodelação do citoesqueleto de actina mediada pelo complexo Arp2 / 3 (DAYEL, HALLERAN, MULLINS, 2001; PETCHAMPAI *et al.*, 2014). Em um estudo desenvolvido por Choi e colaboradores (2013), por meio de estudos em seres eucariotas mutantes para Arp2, observaram que a fosforilação dessa proteína aumenta a atividade do complexo Arp2/3 de nucleação, porém apesar dessa descoberta seu papel em processos celulares permanece indeterminado.

2. JUSTIFICATIVA

Já se passaram mais de 100 anos que o médico e pesquisador brasileiro Carlos Chagas comunicou a descoberta da Doença de Chagas. As características do *T. cruzi*, bem como os vetores, reservatórios, apresentação clínica, epidemiologia e a patologia da doença causada por este protozoário, foram descobertos em 1908 na cidade de Lassance (MG), por Carlos Chagas, e tornados públicos através da publicação de seu artigo histórico “*Nova tripanosomíase humanos. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de Schizotrypanum cruzi n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem*”, na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909).

Os tripanosomatídeos são de grande importância para a saúde pública pelo fato da doença de Chagas ter se disseminado para diferentes territórios no mundo todo, mostrando diferentes vias de transmissão, tais como congênita, oral, transfusional. O sofrimento humano causado por essa infecção poderia ser reduzido com investimentos dedicados à pesquisa em saúde por meio da busca do desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, no entanto, o baixo investimento em pesquisas nos países em desenvolvimento ainda é baixo. Uma vez que ainda não há drogas eficazes contra o parasito durante a fase crônica da doença, e devido a graves efeitos colaterais, e alto custo do tratamento, a presença de proteínas que possam interferir na infecção pelo parasito, as coloca como possíveis alvos de quimioterapia.

Sabe-se que para o parasito invadir e multiplicar, algumas vias de sinalização são ativadas e /ou inibidas nas células. Ainda não se conhece quais exatamente e como são participantes nesses processos, porém sabe-se que a proteína P21, que é uma proteína secretada pelo *Trypanosoma cruzi*, aumenta a internalização do parasito por meio da polimerização da actina. Visto isso, buscamos estudar algumas proteínas do citoesqueleto relacionadas à polimerização da actina, com a finalidade de compreender se estão interligadas as ações realizadas pelos parasitos (adesão, invasão, multiplicação) e possivelmente se estão relacionadas aos efeitos causados pela P21-His₆ na célula.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o envolvimento das proteínas Arp2, Septina4 e Septina14 na invasão e multiplicação intracelular de *T. cruzi*, e na atividade biológica da P21 em mioblastos e macrófagos murinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o envolvimento das proteínas Arp2, Septina 4 e Septina 14 na invasão celular e multiplicação por *T. cruzi*;
- Estudar o papel destas proteínas na célula hospedeira durante a polimerização de actina na presença da forma recombinante da P21 de *T. cruzi*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS DE CÉLULAS

Foram utilizadas células C2C12 (mioblastos de murinos), obtidas no Banco de Células do Rio de Janeiro - UFRJ, e células de medula óssea de camundongos C57BL/6 transformadas em macrófagos e imortalizadas (denominadas macrófagos imortalizados de B6 - iMo B6), as quais foram gentilmente cedidas pelo Me. Alexandre Luiz Neves Silva, do Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata, da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto. Utilizou-se também células Vero (células epiteliais de rim de macaco verde africano) para manutenção do ciclo de vida do *T. cruzi in vitro*. Essas células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Cultilab[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell[®]), L-glutamina (2 mM) (Gibco[®] 00380), D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L) (Promega[®] H5302), piruvato de sódio (1100 mg/L) (Sigma[®] P2256), penicilina (60 mg/L) (Ariston[®]), gentamicina (40 mg/L) (Amresco[®] 0304) e estreptomicina (10 mg/L) (Vitrocell[®] 00038), e incubadas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

4.2 PARASITOS

As formas Tripomastigotas de Cultura de Tecido (TCT) da cepa G (YOSHIDA, 1983) e Amastigotas Extracelulares (AE) da mesma cepa foram utilizadas respectivamente nos ensaios de multiplicação e invasão celular. TCTs foram obtidas a partir da infecção de células Vero com formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou outras formas TCTs e com sete a dez dias após infecção, os parasitos (TCT) encontram-se no sobrenadante. AE foram obtidos a partir da incubação de tripomastigotas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), pH 5.8, suplementado com 5% SFB e 0,2% de Glicose, por 16 a 18 h a 37°C (MORTARA, 1991).

4.3 TRANSDUÇÃO DE CÉLULAS COM PARTÍCULAS DE LENTIVIRUS PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS *KNOCKDOWN*

Na placa de cultura de seis poços, as células foram plaqueadas em um poço (2×10^5 células/poço em 2mL de meio DMEN, sem antibiótico, suplementado com SFB) e incubadas a 37°C a 5% de CO₂ por 24h para obterem a confluência de 60 - 80%. Posteriormente as partículas de lentivirus contendo *small harpain* RNA (shRNA) para ARP2 (sc-29738-V Santa Cruz[®]), Septina 4 (sc-36477-V Santa Cruz[®]) e Septina14 (sc-153339-V Santa Cruz[®]) foram administrados nas células em associação com 5µg/mL de Polybrene (Santa Cruz[®] - sc134220), um meio utilizado para neutralizar a carga da membrana da célula e facilitar sua ligação com capsídeo viral, conforme orientações do fabricante. As células foram repicadas para os demais poços da placa e quando se atingiu confluência de 80% nestes poços, iniciou-se o tratamento com 5µg/mL de Puromicina (Santa Cruz[®] sc108071) adicionada ao meio DMEM para a seleção das células transfectadas carregando o gene inserido. As células foram mantidas nesse meio por pelo menos três passagens e posteriormente tiveram as concentrações de puromicina retiradas gradativamente. Para produção de grupos controles foram feitas transduções de células utilizando shRNA não relacionado.

Para a confirmação do *knockdown* (KD), células *wild-type* (WT) e *knockdown* para Arp2, Septina4 e Septina14 foram contadas e fixadas em formaldeído 4% (Millipore[®]) por pelo menos uma hora, lavadas com PBS e colocadas em solução de PBS+Gelatina 0,25% + Azida Sódica 0,1% (PGN) por 3 h. Uma solução de 1×10^6 /mL de células foi preparada e anticorpos feitos em coelho anti-arp2 (Santa Cruz[®] sc 15389) e anti-Septina4 (Santa Cruz[®] sc 20179) e anticorpos feito em cabra anti-Septina14 (Santa Cruz[®] sc244109) foram incubados em uma diluição de 1:100 feita em PGN+0,1% Saponina *overnight* a 4°C. No dia seguinte as amostras foram lavadas com PBS e incubadas a 1:100 em PGN+Saponina com um anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo verde (FITC) anti-coelho (Invitrogen[®] A11034) ou anti-cabra (Molecular Probes[®]). Após 3 h as células foram lavadas em PBS e ressuspensas em PBS e submetidas a análise no citometro FACSCanto[™] II. Os resultados da citometria foram analisados pelo software FlowJo 10 (<http://www.flowjo.com/>).

4.4 ENSAIO DE INVASÃO

Para verificar a interferência da diminuição de expressão das proteínas ARP2, Septina 4 e 14 na invasão do parasito, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células/poço em suspensão com 500 μ L de DMEM com 10% de SFB. Como controle foram plaqueadas as células WT e controle (Ctrl KD), transduzido com um shRNA não relevante.

As placas foram incubadas *overnight* para aderência e posteriormente, a forma AE da cepa G foi colocada para invadir as células, na quantidade de 5 parasitos/célula. Após 2h à 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂, os poços foram lavados 3 vezes com PBS para retirada de parasitos que não invadiram as células. Após lavagem, solução Bouin (Sigma-Aldrich®) foi adicionada aos poços por 15 min para fixação. As células foram lavadas 6 vezes com PBS e coradas com Giemsa 1:20 filtrado, durante 30 min. As lamínulas foram descoradas em soluções contendo concentrações decrescentes de acetona e crescentes de xilol e após secagem das mesmas, prosseguiu-se com a montagem das lâminas de vidro usando Entellan (Merck®). As lamínulas foram observadas em microscópio de luz sob aumento de 1000x. Foram contadas 100 células para determinação da porcentagem de invasão e a carga parasitária nestas células infectadas também foi contabilizada. Os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

4.5 ENSAIO DE MULTIPLICAÇÃO

Nos ensaios de multiplicação células foram plaqueadas em suspensão com DMEM suplementado com 10% de SFB em placas de 24 poços nas concentrações 8×10^5 /poço em 500 μ L de DMEN para o tempo de 48h e 6×10^5 /poço em 500 μ L de DMEN para os tempos de 72h e 96h. As placas foram incubadas *overnight* para aderência e posteriormente, a forma TCT da cepa G foi colocada para invadir as células, na quantidade de 2 parasitos/célula. Após 2h à 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂, os poços foram lavados 3 vezes com PBS para retirada de parasitos que não invadiram as células e posteriormente DMEN foi repostado e incubados por 48h, 72h e 96h.

Para a análise do ensaio foi realizada a reação de imunofluorescência indireta. As lamínulas foram fixadas com formaldeído 4% (Merck®) por 1h. Lavou-se três vezes

com PBS e em seguida permeabilizou-se com saponina 0,1% (Sigma®) em PGN (PBS com 0,15% gelatina, 0,1% NaNO₃ em PBS). As lamínulas foram então incubadas com anticorpos de soro chagásico (diluídos 1:500 em PGN+Saponina) por 1h em câmara úmida a temperatura ambiente. Lavou-se três vezes com PBS e a reação foi revelada com anti-IgG de humano conjugado com FITC (Sigma®), diluído 1:30 em PGN acrescido de 1:500 de DAPI (cloridrato de 4',6- diamindino-2-fenilindol, Molecular Probes®) para marcação de DNA e incubados por 3h. Após três lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro com glicerol tamponado com 0,1M de Tris pH 8.6 e 0,1% de *p*-fenilenodiamina (PPD) (Sigma®). As lamínulas foram examinadas em microscópio confocal (Zeiss®, LSM 510 Meta, Germany) acoplado com um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200M do Laboratório de Histologia da UFU. As imagens foram adquiridas usando objetiva de 63x com óleo de imersão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em três experimentos independentes e foi feita a contagem do número de parasito em 100 células.

4.6 TRATAMENTO DE CÉLULAS *KNOCKDOWN* COM P21-His₆

4.6.1 Obtenção de P21-His₆

Escherichia coli da linhagem BL21, transfectadas com plasmídeo pET-28a(+) (Novagen®) contendo o gene que codifica para a P21 foram crescidas em um pré-inóculo a 37°C em meio LB com o antibiótico Canamicina (15µg/mL) por 18h. O pré-inóculo foi diluído 1:50 no mesmo meio e incubado a 37°C, com agitação a 150rpm, até atingir Abs.600=0,6-0,9 quando foi adicionado 1mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), para indução da produção proteica. Deixou-se incubando por mais 3 h. A cultura pós-indução foi centrifugada a 1600 x g por 10min a 4°C, e o precipitado foi ressuspense em PBS gelado, na proporção 2mL de PBS para cada 10mL da cultura. O material foi congelado durante a noite e, após descongelamento, foi incubada com 1mg/mL de lisozima por 20 min antes de ser sonicada. A amostra sonicada foi centrifugada em tubos *ependorfs* de 1,5mL a 20200 x g por 20min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspense em tampão com uréia 6M (Amresco® 0378).

A amostra foi incubada com resina de níquel, para purificação da proteína recombinante P21-His₆, e incubado por 2h sob agitação a 4°C. Após três lavagens em

Binding Buffer (imidazol 5mM, NaCl 500mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 6M), a resina foi lavada três vezes com *Washing Buffer* (imidazol 20mM, NaCl 500mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0, uréia 6M) e, por fim, quatro eluições com *Elution Buffer* (imidazol 1M, NaCl 500mM, Tris-HCl 20mM pH 8,0, uréia 6M). Esses tampões contêm concentrações crescentes de imidazol que competem com a cauda de histidina da P21 para se ligar a coluna de níquel. A maior afinidade do imidazol pela coluna promove a liberação da proteína recombinante purificada.

Todo o material eluído foi dialisado em uma membrana de diálise de 3,5kDa (Spectra/Por[®] 131198) por 48 h imersa em PBS para a purificação da proteína. A concentração da amostra foi quantificada por espectrofotometria utilizando-se a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976) e um gel de SDS-PAGE 13% (LAEMMLI, 1970) com coloração de Coomassie foi realizado para se verificar a pureza da proteína recombinante eluída.

4.6.2 Citometria de fluxo

Para estudar o efeito da P21-His₆ na intensidade de polimerização do citoesqueleto de actina das células KD, as células foram plaqueadas a 1×10^6 por poço em placa de 6 poços (Kasvi[®]) e mantidas até o dia seguinte quando foram incubadas com 40µg/mL de P21-His₆, durante 1 hora. Após esse tempo as células foram raspadas com *cell scraper* (Corning[®]) e fixadas em formaldeído 4% (Millipore[®]) por pelo menos uma hora, lavadas com PBS e colocadas em solução de PBS+Gelatina 0,25%+ Azida Sódica 0,1% (PGN) por 3 h. As células foram incubadas em uma solução de faloidina-TRITC (Sigma[®] P1951) a 1:500 feita em PGN+0,1% Saponina durante 2 h, lavadas com PBS e submetidas a análise no citometro FACSCanto[™] II. Os resultados da citometria foram analisados pelo software FlowJo 10 (<http://www.flowjo.com/>) e pelo software ©GraphPad[®] Prism 6 (<http://www.graphpad.com/>).

4.7 NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

Todo procedimento *in vitro*, envolvendo manuseio dos parasitos, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2005).

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados em triplicata de pelo menos três experimentos independentes. A significância dos experimentos foi determinada pelo método ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett, realizado pelo programa GraphPad Prism (©GraphPad Software[®] Inc, 1992-2007) versão 6.01. Os resultados foram mostrados como Média + Erro Padrão da Média (E.P.M) e considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (*).

5 RESULTADOS

5.1 CONFIRMAÇÃO DA REDUÇÃO DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ARP2, SEPTINA 4 E 14 NAS CÉLULAS

Para confirmar se as células foram transduzidas, iMo B6 foram submetidos à citometria de fluxo. Na figura 2A e 2B, as células WT e Arp2 KD foram marcadas com anticorpo anti-Arp2 e observamos que a intensidade de fluorescência emitida pela célula Arp2 KD (em azul) diminuiu em relação ao grupo WT (em rosa) indicando que houve redução de expressão da proteína na célula assim como esperado. O mesmo padrão seguiu para as demais proteínas assim como representado na figura 2C em dados analisados por ©GraphPad® Prism 6.

5.2 INTERFERÊNCIA NA INVASÃO DE *T. cruzi* EM MACRÓFAGOS E MIOBLASTOS *KNOCKDOWN*

As linhagens celulares submetidas a transdução foram utilizadas para realização de ensaios de invasão para avaliar se a redução da expressão de Arp2, Septina 4 e 14 na célula seria capaz de afetar a internalização do parasito na célula. Na figura 3A inferimos que não houve diferença na porcentagem de iMo B6 infectados entre os controles selvagens (WT), controle de transfecção (Ctrlr KD) e as proteínas testadas (Septina 14 KD e Arp2 KD). Também observamos que a relação entre parasitos por célula infectadas não apresentou diferenças significativas (figura 3B). Já em relação aos mioblastos C2C12, a figura 4A mostra uma diferença significativa no número de células infectadas comparando o grupo controle WT e as células testadas Arp2 KD e Septina 4 KD ($P = 0,0001$ para Arp2KD e Septina 4KD). A quantidade de parasitos por células não apresentou alterações quando comparamos grupos controles com as células KD (figura 4B). (*obs.: não foi possível obter dados suficientes para análises da linhagem celular de iMo B6 Septina 4KD*).

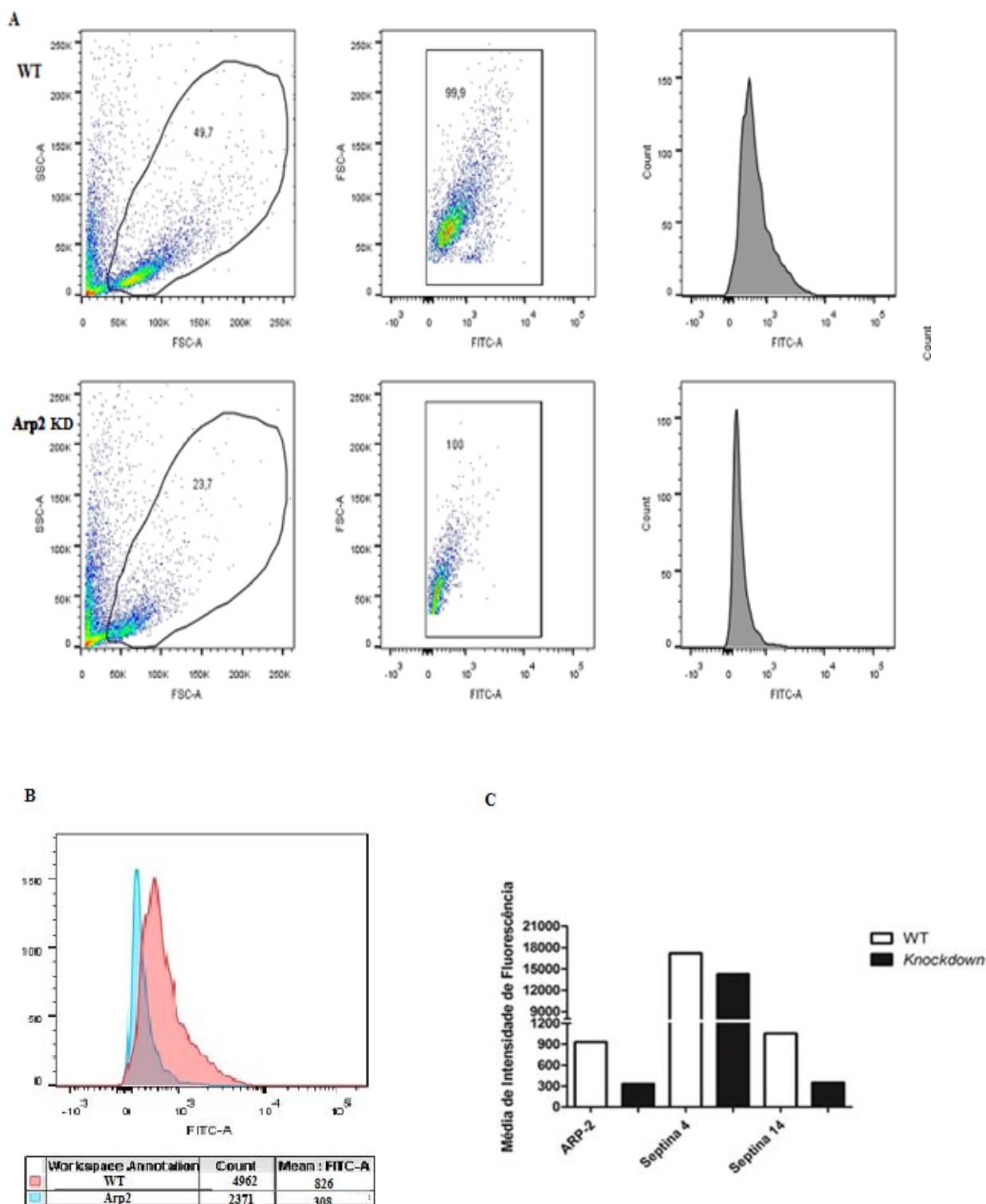


Figura 2: Análise da redução de expressão de proteínas em iMo B6. As células foram submetidas ao protocolo conforme item 4.3 e os resultados da citometria foram analisados pelo software FlowJo 10®. Em (A) observa-se dados obtidos para células WT e Arp2 KD e (B) a tabela com intensidade média de fluorescência das células WT e Arp2 KD. Em (C) resultados obtidos na citometria para as células Arp2 KD, Septina 4 KD e 14 KD foram compilados utilizando software ©GraphPad® Prism 6 mostrando redução de expressão das proteínas nas células.

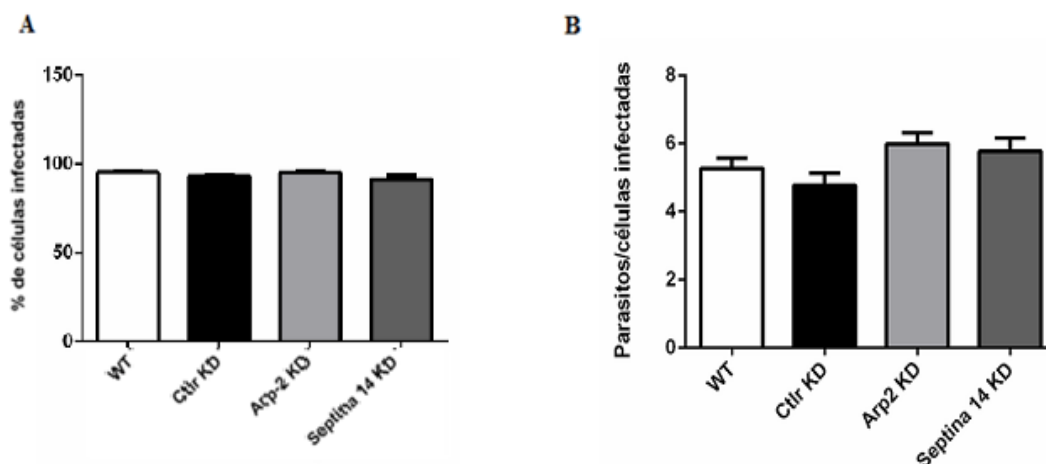


Figura 3: Ensaio de invasão de formas amastigotas extracelulares de *T. cruzi* em iMo B6. 2h após a infecção as lâminas foram coradas com Giemsa segundo protocolo descrito em 4.4. (A) % de células infectadas. Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle (B) relação parasitos/células infectadas. Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Resultados expressos como Média + E.P.M. *Representa diferença significativa em relação ao grupo controle ($p=0,001$), obtida pelo teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett.

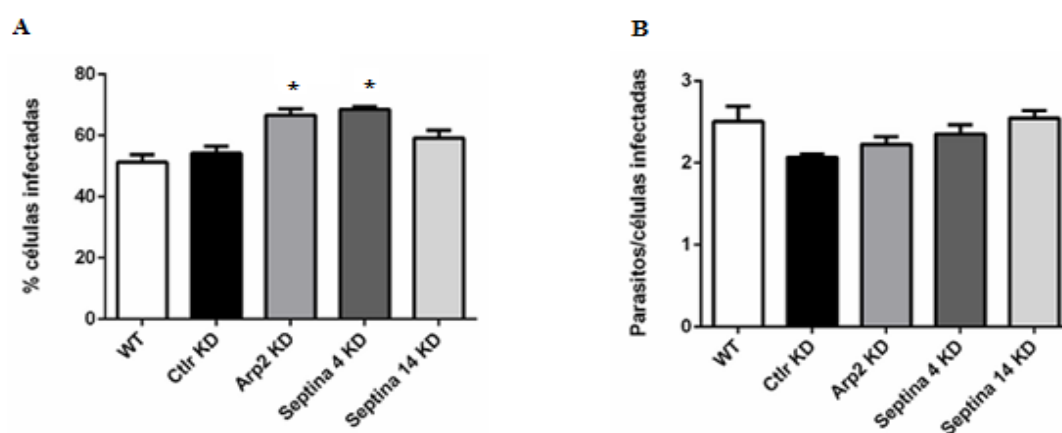


Figura 4: Ensaio de invasão de formas amastigotas extracelulares de *T. cruzi* em mioblastos C2C12. 2 h após a infecção as lâminas foram coradas com Giemsa segundo protocolo descrito em 4.4. (A) % de células infectadas. Houve diferença com $P=0,0001$ para Arp2KD e Septina 4KD (B) relação parasitos/células infectadas. Não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Resultados expressos como Média + E.P.M. *Representa diferença significativa em relação ao grupo controle ($p=0,001$), obtida pelo teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett.

5.3 INTERFERÊNCIA NA MULTIPLICAÇÃO DE *T. cruzi* EM MACRÓFAGOS E MIOBLASTOS *KNOCKDOWN*

No ensaio de multiplicação realizado em iMo B6, observa-se que na figura 5A, no tempo de 48h, houve um aumento significativo no número de parasitos nas células Septina 14 KD em relação ao controle selvagem (WT) ($F_{(3,68)}=8,272$, $p=0,0001$). No tempo de 72h (figura 5B), Arp2 KD e Septina14 KD apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle (WT) ($F_{(3,44)}=5,577$, $p=0,02$). Na figura 5C, no tempo 96h observa-se aumento significativo também para as células Arp2 KD e Septina14 KD em relação ao grupo controle (WT) ($F_{(3,42)}=22,634$, $p=0,0001$). Imagens dos ensaios de multiplicação realizados em iMo B6 foram obtidas em microscópio confocal e estão representadas respectivamente, na figura 6 para o tempo de 48h, figura 7 para o tempo de 72h e figura 8 para o tempo de 96h.

(*obs.: não foi possível obter dados suficientes para análises da linhagem celular de iMo B6 Septina 4KD*).

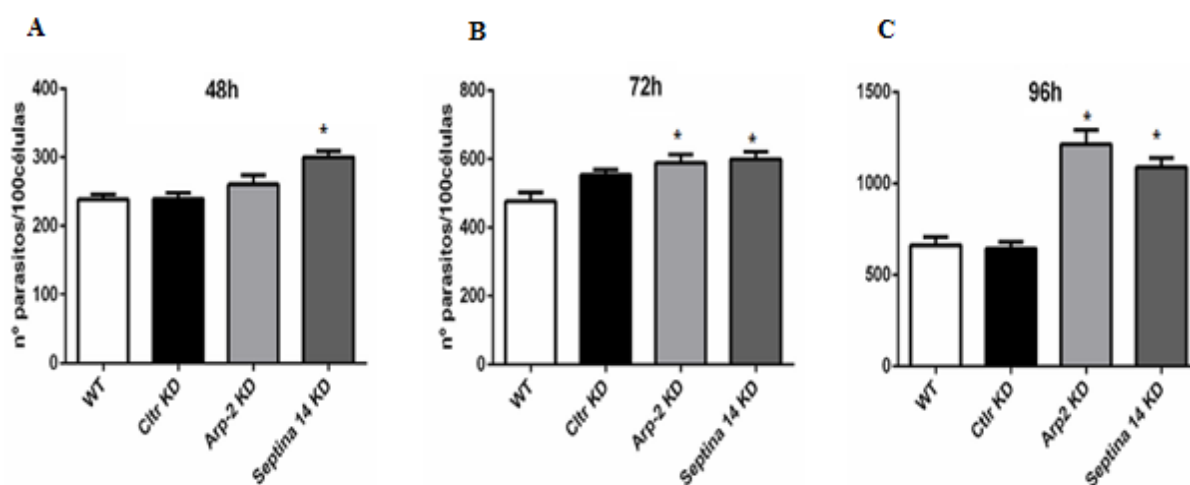


Figura 5. Ensaio de multiplicação de *T. cruzi* em iMo B6. Protocolo conforme item 4.5. (A) nº de parasitos/100 células 48h após a infecção. É possível notar um aumento significativo na multiplicação dos parasitos nas células Septina 14 KD ($p=0,001$) em relação WT, (B) nº de parasitos/100 células 72h após infecção. Houve aumento significativo na multiplicação dos parasitos nas células Arp2 KD ($p=0,09$) e Septina 14 KD ($p=0,02$) em relação WT, (C) nº de parasitos/100 células 96h após a infecção. Houve aumento significativo na multiplicação dos parasitos nas células Arp2 KD ($p=0,0001$) e Septina 14 KD ($p=0,0001$) em relação a WT. Resultados expressos como Média + E.P.M. *Representa diferença significativa em relação ao grupo controle ($p=0,001$), obtida pelo teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett.

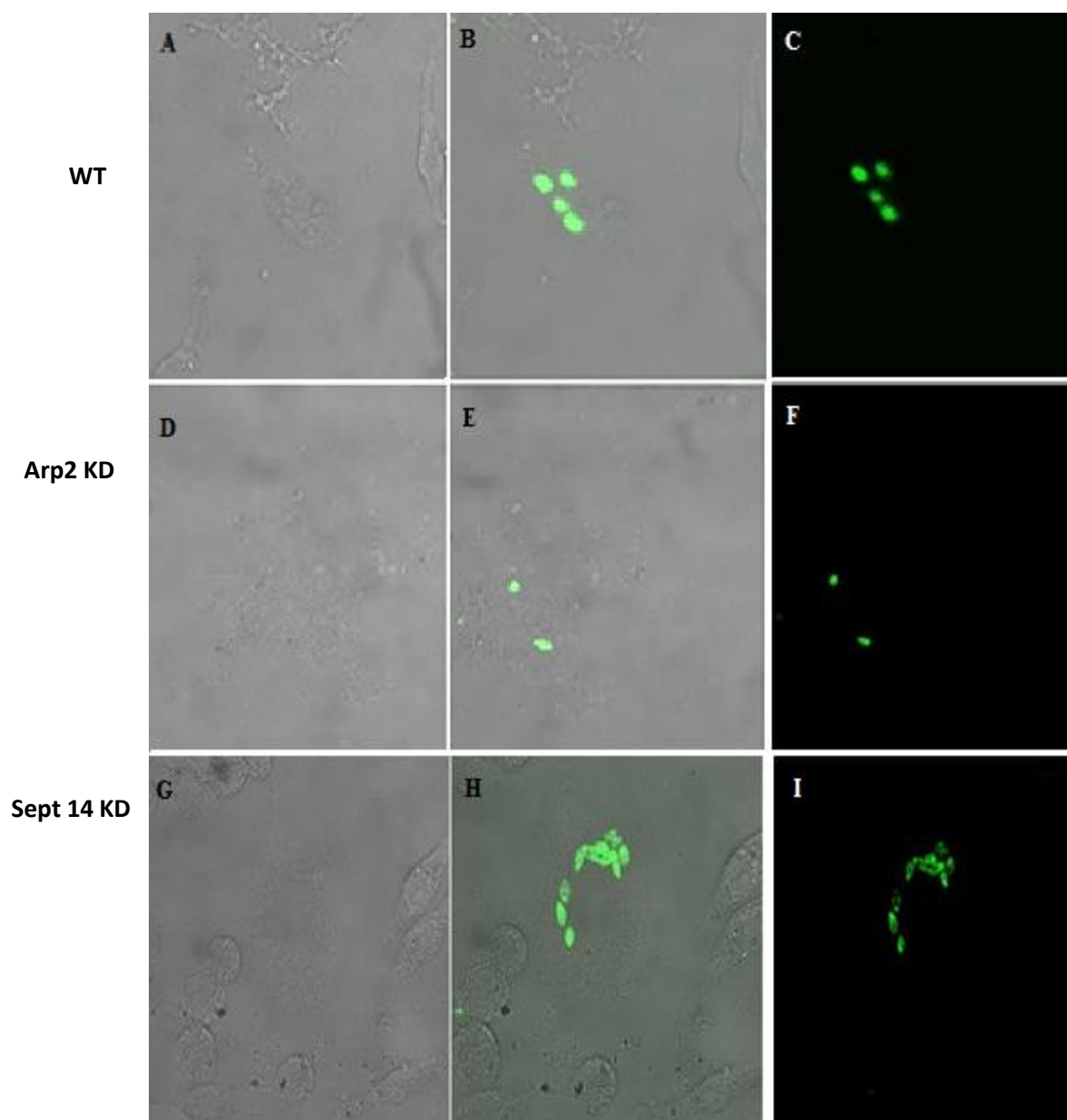


Figura 6. Ensaio de multiplicação iMo B6 48h após infecção, submetidas ao protocolo de imunofluorescência (item 4.5). (A,D,G,) macrófagos observados por microscopia de contraste de fase, (B,E,H), sobreposição de imagens, (C,F,I) detecção de parasitos com anticorpo anti- *T. cruzi* conjugado com fluorocromo FITC (verde). Imagens adquiridas em microscópio confocal em aumento de 40x. Barras de aumento: 10µm

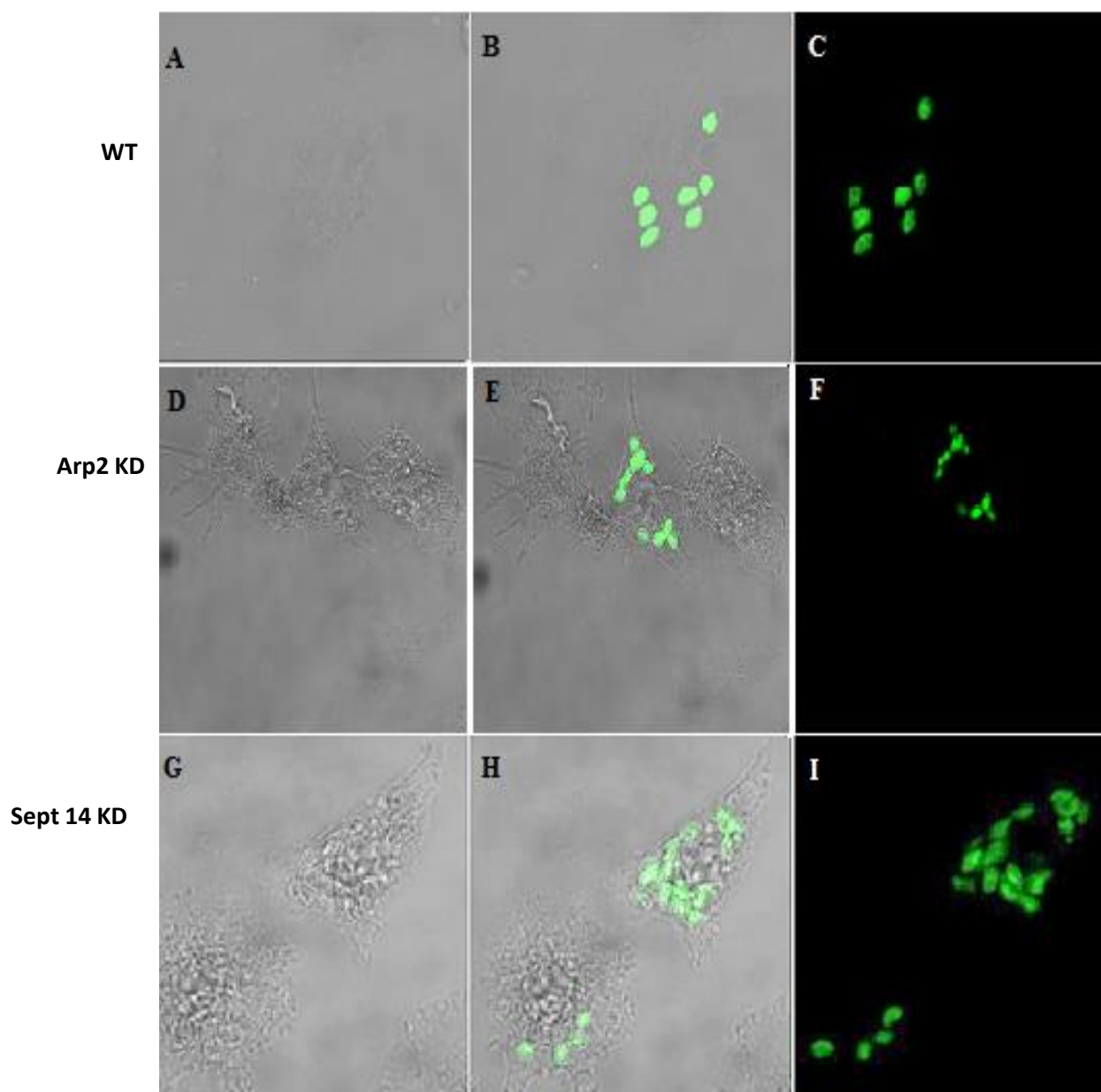


Figura 7. Ensaio de multiplicação em iMo B6 72h após infecção, submetidas ao protocolo de imunofluorescência (item 4.5).). (A,D,G,) macrófagos observados por microscopia de contraste de fase, (B,E,H), sobreposição de imagens, (C,F,I) detecção de parasitos com anticorpo anti- *T. cruzi* conjugado com fluorocromo FITC (verde). Imagens adquiridas em microscópio confocal em aumento de 40x. Barras de aumento: 10µm

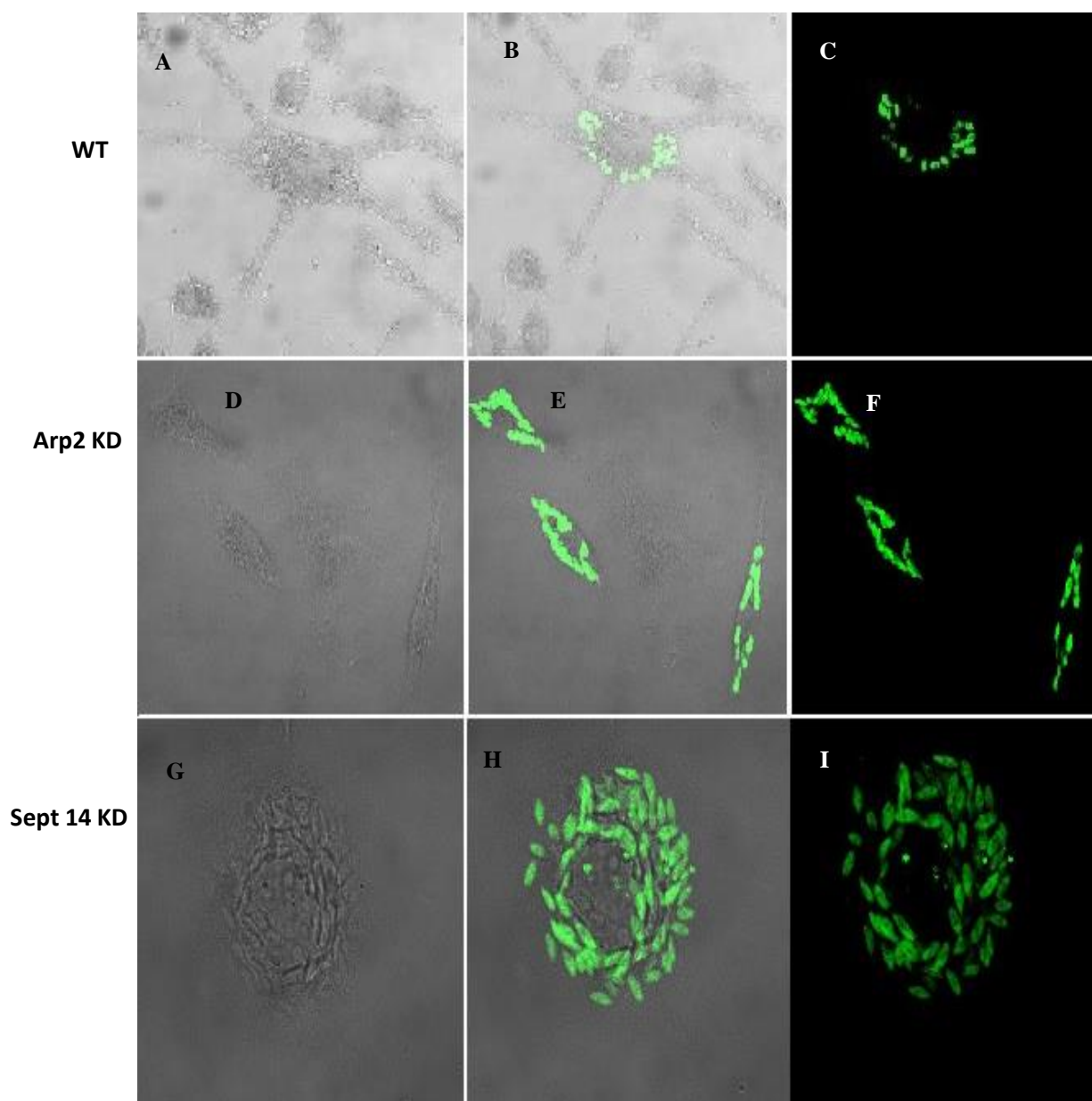


Figura 8. Ensaio de multiplicação em iMo B6 96h após infecção, submetidas ao protocolo de imunofluorescência (item 4.5). (A,D,G,) macrófagos observados por microscopia de contraste de fase, (B,E,H), sobreposição de imagens, (C,F,I) detecção de parasitos com anticorpo anti- *T. cruzi* conjugado com fluorocromo FITC (verde). Imagens adquiridas em microscópio confocal em aumento de 40x. Barras de aumento: 10 μ m

No ensaio de multiplicação realizado em mioblastos C2C12, observa-se que na figura 9A, no tempo de 48h, houve um aumento significativo no número de parasitos nas células Arp2 KD em relação ao controle selvagem (WT) ($F_{(4,63)}=7,509$, $p=0,0001$). No tempo de 72h (figura 9B), Septina4 KD apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle (WT) ($F_{(4,43)}=16,859$, $p=0,0001$). Na figura 9C, no tempo 96h observa-se aumento significativo para as células Septina4 KD em relação ao grupo controle WT ($F_{(4,30)}=11,125$, $p=0,0001$). Imagens dos ensaios de multiplicação realizados em mioblastos C2C12 foram obtidas em microscópio confocal e estão representadas respectivamente, na figura 10 para o tempo de 48h, figura 11 para o tempo de 72h e figura 12 para o tempo de 96h.

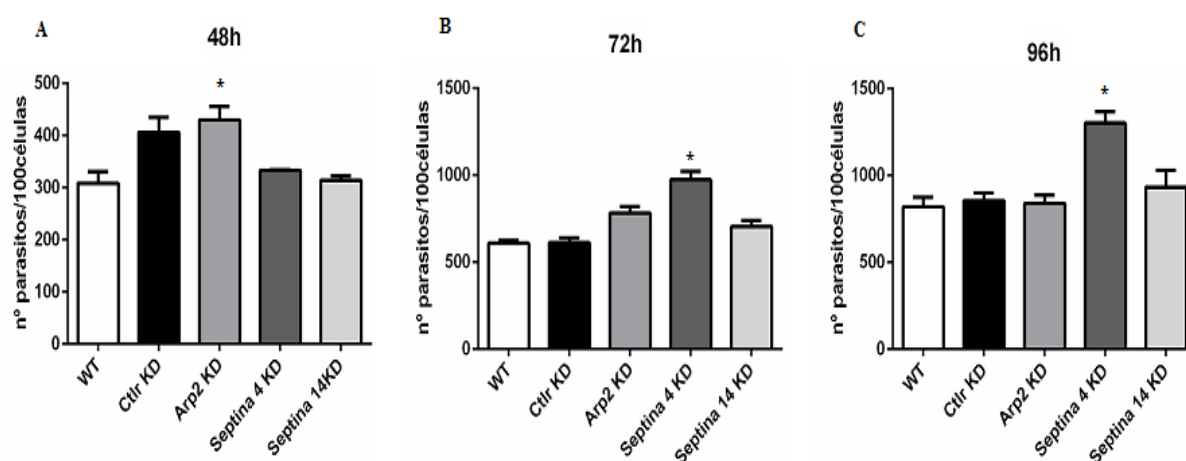


Figura 9. Ensaio de multiplicação de *T. cruzi* em mioblastos C2C12. As células foram submetidas ao protocolo de item 4.5. (A) nº de parasitos/100 células 48h após a infecção. É possível notar um aumento significativo na multiplicação dos parasitos nas células Arp2 KD ($p=0,0001$) em reação ao grupo WT, (B) nº de parasitos/100 células 72h após infecção. Houve aumento significativo na multiplicação dos parasitos nas células Septina 4 KD ($p=0,0001$) em relação WT, (C) nº de parasitos/100 células 96h após a infecção. Houve aumento significativo na multiplicação dos parasitos nas células Septina 4 KD ($p=0,0001$) em relação a WT. Resultados expressos como Média + E.P.M. *Representa diferença significativa em relação ao grupo controle ($p=0,001$), obtida pelo teste ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Dunnett.

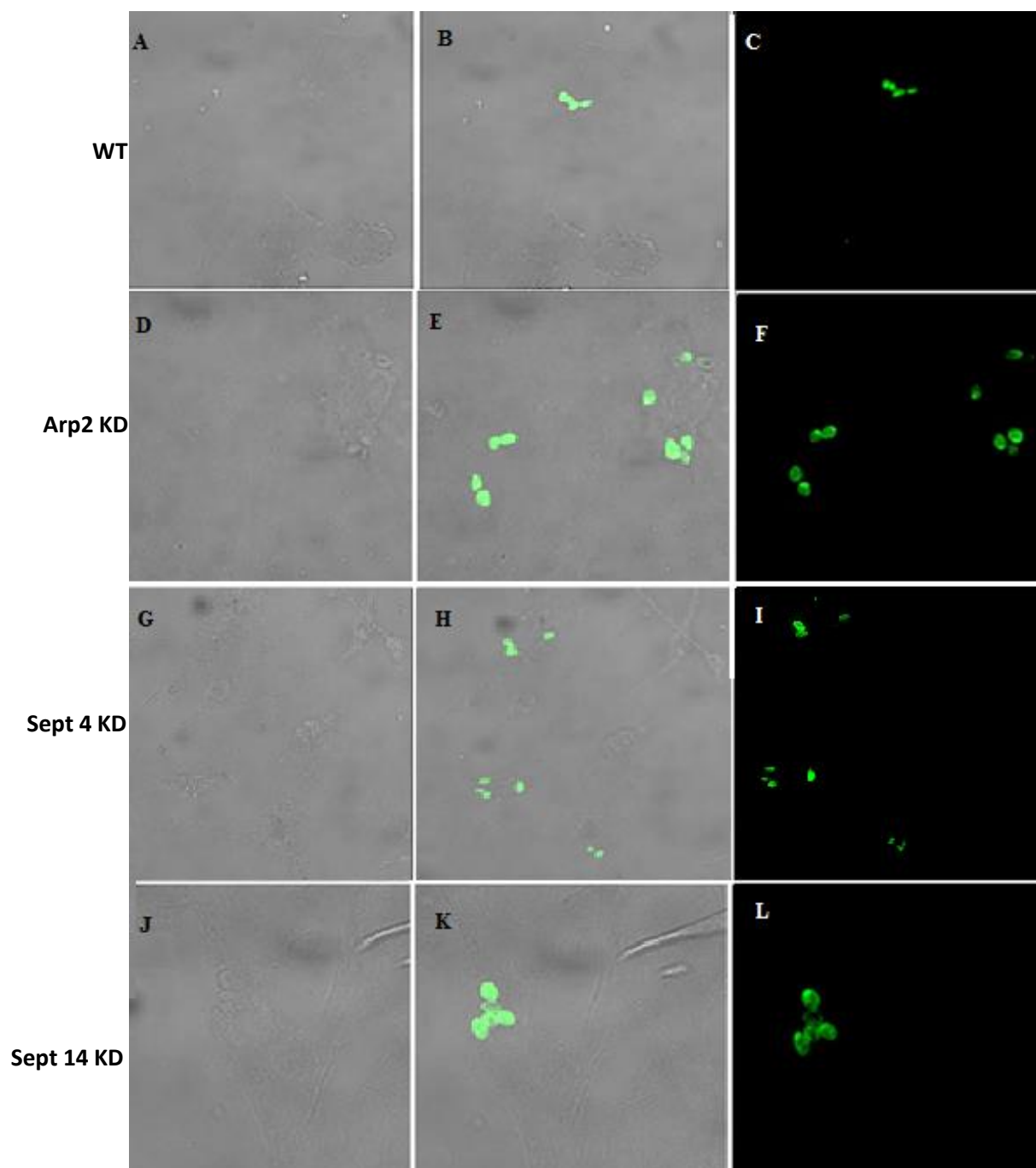


Figura 10. Ensaio de multiplicação em mioblastos C2C12 48h após infecção, submetidas ao protocolo de imunofluorescência (item 4.5). (A,D,G,J,) mioblastos observados por microscopia de contraste de fase, (B,E,H,K), sobreposição de imagens, (C,F,I, L) detecção de parasitos com anticorpo anti- *T. cruzi* conjugado com fluorocromo FITC (verde). Imagens adquiridas em microscópio confocal em aumento de 40x. Barras de aumento: 10µm

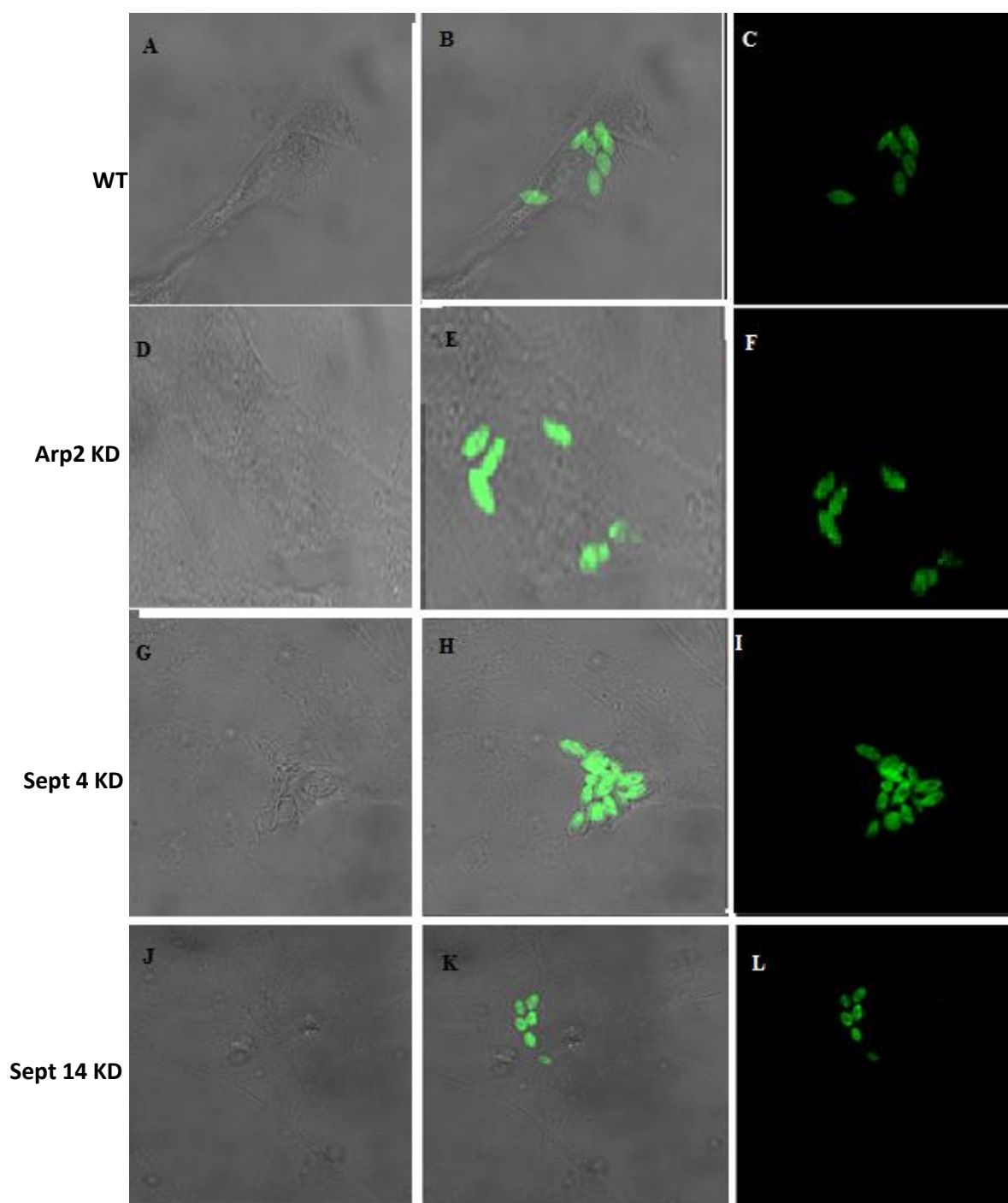


Figura 11. Ensaio de multiplicação em mioblastos C2C12 72h após infecção, submetidas ao protocolo de imunofluorescência (item 4.5). (A,D,G,J) mioblastos observados por microscopia de contraste de fase, (B,E,H,K), sobreposição de imagens, (C,F,I,L) detecção de parasitos com anticorpo anti- *T. cruzi* conjugado com fluorocromo FITC (verde). Imagens adquiridas em microscópio confocal em aumento de 40x. Barras de aumento: 10µm

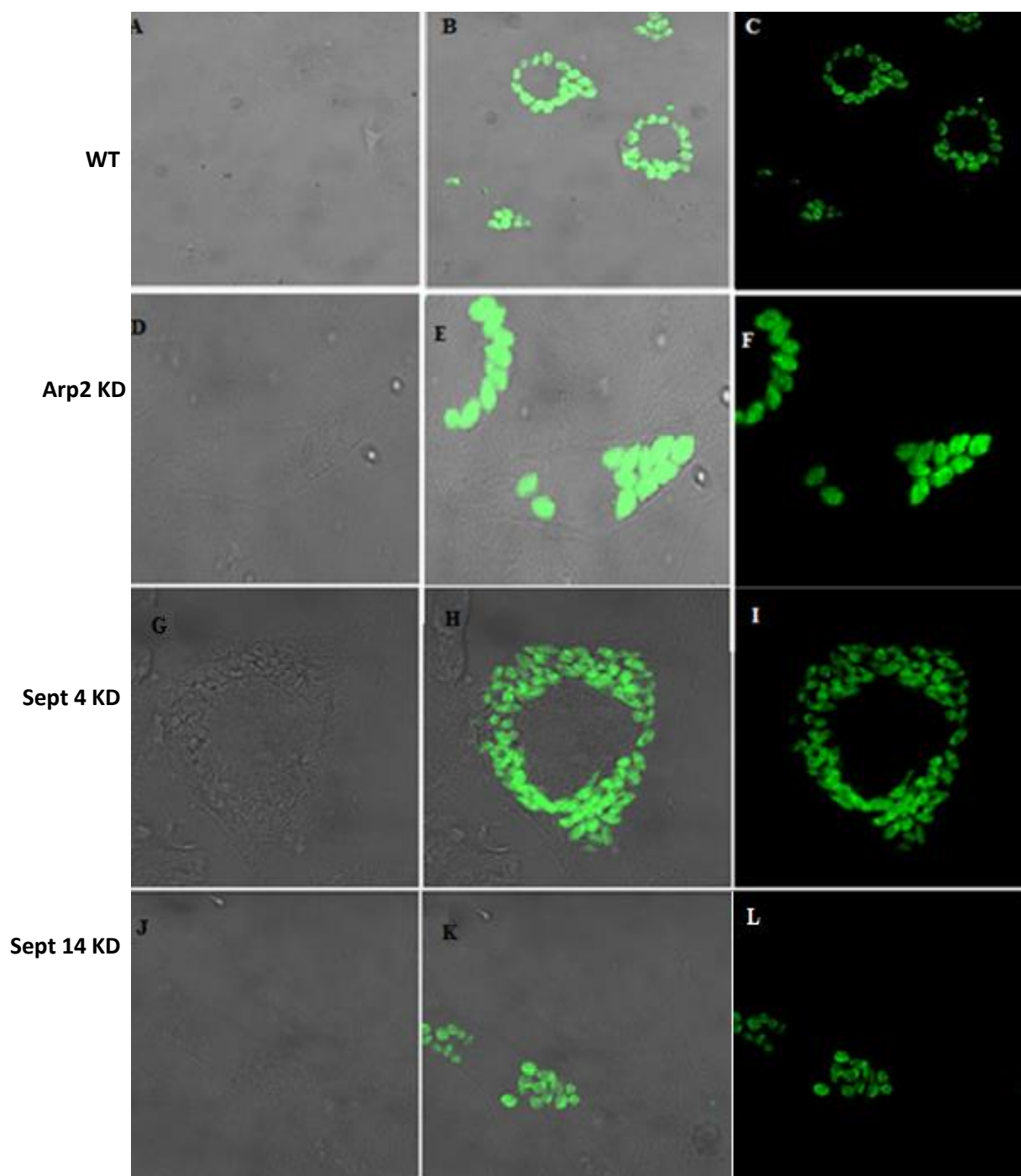


Figura 12. Ensaio de multiplicação em mioblastos C2C12 96h após infecção, submetidas ao protocolo de imunofluorescência (item 4.5). (A,D,G,J) mioblastos observados por microscopia de contraste de fase, (B,E,H, K), sobreposição de imagens, (C,F,I,L) detecção de parasitos com anticorpo anti- *T. cruzi* conjugado com fluorocromo FITC (verde). Imagens adquiridas em microscópio confocal em aumento de 40x. Barras de aumento: 10μm

5.4 EFEITO DO TRATAMENTO DE CÉLULAS *KNOCKDOWN* COM P21-His₆

Para obter mais informações a respeito de quais proteínas possivelmente poderiam fazer parte da via de indução do aumento da fagocitose pela proteína recombinante P21, empregamos o modelo de células *knockdown* para Arp2 e Septina 14. Na figura 13 podemos observar que, diferentemente do que ocorre nas células controle, o tratamento das células Arp2 KD e Septina14 KD com P21-His₆ não aumentou a intensidade média de fluorescência da actina, ou seja, não houve interferência na polimerização de actina em células KD tratadas.

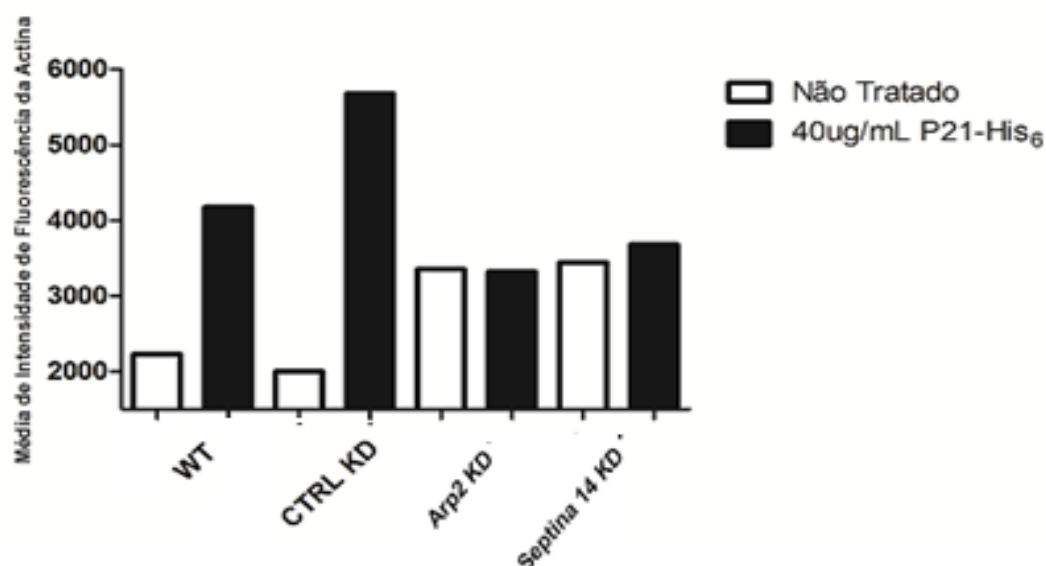


Figura 13. Intensidade média de fluorescência para actina em iMo B6 KD. A intensidade de fluorescência da actina foi quantificada de acordo com o item 4.6.2. Observa-se que as células tratadas com P21-His₆, Arp2KD e Septina 14KD, apresentaram média de intensidade de fluorescência de actina semelhante as células não tratadas, diferentemente do que é observado nas células controle, em que o tratamento com P21-His₆ interfere na polimerização de actina. Os resultados foram compilados utilizando software ©GraphPad® Prism 6.

6 DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares que regulam a patogenicidade de *T. cruzi* não estão totalmente esclarecidos, apesar do considerável progresso feito no sentido de esclarecer mecanismos de invasão celular e sobrevivência do parasito dentro das células hospedeiras (ZINGALES e COLI, 1985; MEIRELLES *et al.*, 1984, 1986; ARAÚJO-JORGE, 1989; BURLEIGH e ANDREWS, 1995). Nesses aspectos reside o grande potencial dos modelos *in vitro* para o estudo da interação *T. cruzi*- célula hospedeira. Há evidências que indicam que a entrada de *T. cruzi* nas células pode ser mediada ativamente pela invasão do parasito ou por meio dos processos de endocitose/fagocitose celular. Esses processos se diferem em relação a sinalização necessária para serem ativados, e o destino do material internalizado (FRANCIS *et al.*, 1993; MERCER, HELENIUS, 2009; WATARAI *et al.*, 2001). Várias proteínas fazem parte das vias de sinalização que permitem a invasão e posterior multiplicação do parasito. Assim, analisamos a importância das proteínas Arp2, Septina 4 e Septina 14 para infecção de *T. cruzi*, reduzindo a expressão destas proteínas nas células. Realizamos a confirmação da redução de expressão das proteínas nas células por citometria de fluxo utilizando iMo B6 como parâmetro (o procedimento em mioblastos foi realizado ao mesmo tempo, utilizando mesmo kit de transfecção). Após a confirmação foram feitos os ensaios de invasão por formas AE de *T. cruzi*, multiplicação das mesmas e interferência de P21-His₆ na polimerização de actinas nas células KD.

O papel dos macrófagos na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos intracelulares, já está bem estabelecido (TALIAFERRO e PIZZI, 1955). Os macrófagos e as células T desempenham uma função importante no controle da infecção chagásica (NATHAN *et al.*, 1979). Mesmo exercendo um papel crucial na função efetora no controle da resposta imune do hospedeiro, os macrófagos representam provavelmente, uma das primeiras células envolvidas na infecção chagásica, sendo capazes de abrigar o parasito e permitir sua multiplicação (SANTELLO, 2005). Por esse fato esta célula foi escolhida como um de nossos modelos de estudo. Fizemos ensaios de invasão e multiplicação com *T. cruzi*, e analisando os resultados percebemos que a redução de expressão da proteína Septina 14 em iMo B6, apesar de não interferir no processo de invasão celular por formas AE de *T. cruzi*, possibilita um aumento na multiplicação de parasitos na célula. Com isso levantamos a hipótese de que a presença

da Septina 14 na célula poderia funcionar como um aparato que impede ou diminui a multiplicação do parasito. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com pesquisas realizadas com bactérias que mostraram que as septinas podem desempenhar um papel importante na capacidade do corpo humano para combater infecções bacterianas. Os pesquisadores descobriram tal comportamento de encarceramento com *Shigella*, uma bactéria que causa diarreia, às vezes letal em humanos e outros primatas. Para propagar de célula para célula, a *Shigella* desenvolve uma “cauda” de polímero de actina que impulsionam as bactérias e permitir-lhes forçar seu caminho para células hospedeiras vizinhas. . Para contra-atacar, as células produzem um fator (proteína de sinalização celular) denominado TNF- α , uma citocina pleiotrópica que organiza uma ampla gama de funções biológicas, incluindo a defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos (LOCKSLEY *et al.*, 2001; MOSTOWY E COSSART, 2011). Quando TNF- α está presente, feixes espessos de septina se ligam a “cauda” de actina formada pela própria bactéria culminando em espécies de 'gaiolas' que as imobilizam facilitando a autofagia e assim, impedindo a invasão em outras células saudáveis (MOSTOWY, 2010; MOSTOWY E COSSART, 2011). Baseado nesse estudo pode-se questionar se a Septina 14 age de forma semelhante com parasitos, para assim entender o mecanismo de interferência da Septina 14 na infecção por *T. cruzi* se torna outro desafio.

iMo B6 Arp2 KD também apresentaram aumento no número de parasitos nos tempos de 72h e 96h em relação ao grupo controle, o que pode ser um indício de que Arp2 é importante para controlar a infecção de *T. cruzi* nesses tempos. Em pesquisa desenvolvida por Johnston e May (2010) os resultados mostraram que na infecção de macrófagos humanos e murinos por *Cryptococcus neoformans* o complexo Arp2/3 tem implicações significativas para sua disseminação no sistema nervoso central. A levedura consegue sobreviver ao ambiente do fagossomo e inicia sua proliferação dentro deste até sua expulsão e consequentemente disseminação. Observou-se que esse processo é controlado pelo complexo Arp2/3 que promove repetidos ciclos de polimerização e despolimerização de actina ao redor do fagossomo, inibindo a expulsão da levedura. Da mesma forma o complexo poderia estar atuando em infecções parasitárias. Assim, o aumento na multiplicação de parasitos em nossos resultados seria explicado pela redução de Arp2, que é responsável por aumentar a atividade do complexo Arp2/3 (CHOI *et al.*, 2013), o qual pode atuar controlando a infecção pela indução da polimerização ou despolimerização de actina.

Os mioblastos, além dos macrófagos, fazem parte de um dos sistemas principais que se tem utilizado para estudar interação *T. cruzi*-célula hospedeira (ARAÚJO-JORGE e MEIRELLES, 2000). Desta forma também utilizamos mioblastos C2C12 para analisar se o tipo celular é determinante na atuação de cada proteína. Observamos aumento significativo de células invadidas e do número de parasitos durante a multiplicação (48h) em mioblastos Arp2 KD. Reed e colaboradores (2012) avaliando proteínas do citoesqueleto que medeiam o processo de invasão celular por de patógenos intracelulares obrigatórios, denominado *Rickettsia parkeri*, silenciaram células utilizando *siRNA* para 105 proteínas. Foram identificadas 21 proteínas centrais importantes para a invasão, entre elas o complexo Arp2/3 mostrou-se crucial para esse processo em células de mamíferos. Em vertebrados e algumas células de linhagem de insetos, o complexo Arp2 / 3 mostrou ser também uma proteína multifuncional essencial para o processo de invasão de vários agentes patogénicos, tais como *Listeria monocytogenes* (AGAISSE *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007), *Candida albicans*, *Escherichia coli* (STROSCHEIN-STEVENSON *et al.*, 2005) *Chlamydia trachomatis* (CARABEO *et al.* 2007; ELWELL *et al.*, 2006), *Yersinia pseudotuberculosis* (AGAISSE *et al.*, 2005), *Salmonella enterica Typhimurium* (UNSWORTH, 2004) *Pseudomonas aeruginosa* (PILLAGE *et al.*, 2008), e *SFG Rickettsia* (MARTINEZ COSSART, 2004; REED,SERIO, WELCH, 2012) (PETCHAMPAI *et al.*, 2014).

Arp2 além de atuar na invasão, parece ter importância fundamental no controle da multiplicação no tempo de 48h. Porém sua atividade pode ter sido compensada por outras proteínas nucleadoras de actina nos tempos de 72h e 96h. Considerando esses achados e nossos resultados, podemos entender a importância de Arp2 para infecção de *T. cruzi* em células de mamíferos.

Visto que já é bem estabelecida a relação de septinas com a dinâmica do citoesqueleto, uma outra septina aqui analisada foi a Septina 4. A diminuição da expressão da proteína em questão parece ter facilitado significativamente a invasão e multiplicação do parasito em mioblastos C2C12. Contudo no tempo de 48 h não encontramos diferenças, possivelmente por erro metodológico que será revisto em novos experimentos a serem realizados antes da publicação do artigo. Pouco se sabe sobre essa proteína, porém assim como a Septina14 sua pode ação pode estar ligada ao citoesqueleto de actina.

Os resultados que obtidos no ensaio de invasão e multiplicação mostraram que as proteínas que atuam em mioblastos se diferem daquelas que atuam em macrófagos,

ou seja, indica que a infecção em diferentes células é modulada por vias similares, porém não idênticas. É importante, também, salientar que foram utilizadas formas amastigotas nos ensaios de invasão, diferentemente dos ensaios de multiplicação, nos quais utilizamos formas tripomastigotas. Isto porque já foi demonstrado que amastigotas são muito mais dependentes do rearranjo do citoesqueleto de actina em sua invasão do que TCT, uma vez que promovem o evento de fagocitose, ou “fagocitose-like” em células não fagocíticas profissionais (MORTARA *et al.*, 2005, FERNANDES *et al.*, 2013). Assim, hipotetizamos que alterações causadas em mioblastos KD nos tempos de invasão podem estar relacionadas com a polimerização da actina que parecem estar correlacionada com as proteínas Arp2 e Septina4.

Sabe-se que requisito fundamental para o ciclo de vida de *T. cruzi* e outros parasitos intracelulares é a habilidade de entrar nas células hospedeiras. Portanto, elucidações sobre os mecanismos usados pelo parasito para invadir são necessárias para entender completamente a biologia do mesmo (ROSESTOLATO *et al.*, 2012) e o mecanismo de interação que ocorre entre parasito-hospedeiro. Sabe-se que diversos patógenos bacterianos e virais induzem a polimerização de actina no citoplasma das células para facilitar a infecção (GOLEY e WELCH, 2006). Uma importante proteína utilizada pelo parasito na sua internalização, denominada P21, foi caracterizada por SILVA e colaboradores (2009). Essa atua induzindo a polimerização da actina e, consequentemente aumentando a internalização de *T. cruzi* (RODRIGUES *et al.* 2012). No presente estudo procuramos conhecer proteínas que façam parte da via utilizada pela P21 para exercer sua ação. Com essa finalidade avaliamos por citometria de fluxo se a diminuição na expressão de Arp2 e Septina 14 em iMo B6 poderiam alterar a polimerização de actina promovida pela P21-His₆, já que em macrófagos a maior parte dos parasitos é interiorizada via mecanismo do tipo fagocítico, envolvendo reestruturação de actina necessária à formação de projeções de membrana, chamadas pseudópodes (NOGUEIRA e COHN, 1976; MEIRELLES *et al.*, 1982). Diferentemente do que ocorre em células controle, verificamos que no caso de células Arp2 KD e SEPT 14 KD tratadas com P21-His₆, não houve alterações na polimerização do citoesqueleto. Diante desse resultado podemos inferir que estas proteínas são necessárias e fazem parte da via utilizada pela P21 para induzir tal efeito, sendo, portanto um alvo hipotético de intervenções para impedir a infecção por *T. cruzi* que se utiliza dessa proteína para invadir os macrófagos.

Martins (2013) mostrou que a P21-His₆, além de atuar na invasão de *T. cruzi* também influencia na multiplicação devido ao aumento de polimerização de actina que tem atividade pro-fagocítica, responsável por proteger o parasito da resposta imune do hospedeiro garantindo ao parasito sua permanência intracelular. Esse processo hipoteticamente é o passo inicial da cronificação, na qual o parasito se mantém em latência no hospedeiro, ou seja, sem se multiplicar. Tal hipótese, de que a P21 é importante para o processo de cronificação da doença, e o fato de que as septinas em infecções bacterianas impedem a disseminação da mesma por meio de seu aprisionamento na célula (MOSTOWY, 2010; MOSTOWY e CROSSART, 2011) nos leva a acreditar que a Septina14 pode fazer parte desse evento. Nossos dados são promissores e indicam que as proteínas aqui estudadas são um alvo hipotético de intervenções para conter a infecção por *T. cruzi*, assim há necessidade de continuação dos estudos *in vitro*.

7. CONCLUSÃO

- Arp2 em mioblastos é importante nos tempos iniciais da infecção, enquanto em macrófagos é importante nos tempos multiplicação de 72h e 96h;
- Septina 14 parece ser importante para conter a propagação de *T. cruzi* em macrófagos;
- Septina 4 parece ser importante para conter a invasão e propagação de *T. cruzi* em mioblastos;
- Acreditamos que Septina 14 e Arp2 fazem parte da via de polimerização de actina induzida pela P21;
- A Septina14 pode ser um importante fator para cronificação da Doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

AGAISSE, H.; BURRACK, L.S.; PHILIPS, J.A.; RUBIN, E.J.; PERRIMON, N., Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. **Science**, v. 309, p. 1248–1251, 2005.

AKIN, O.; MULLINS, R. D. Capping Protein Increases the Rate of Actin-based Motility by Promoting Filament Nucleation by the Arp2/3 Complex. **Cell**, v. 133, p. 841–851, 2008.

ALVES, M. C.S.; SILVA, D.R.; BATISTA, W.S.; OLIVEIRA, G.M. Uso da associação de benznidazol e espironolactona em camundongos na fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, p. 179-193, 2012.

ANDRADE, S.G. Patologia Experimental da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap 11, p.177-200, 2000.

ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Trends Cell Biology** v. 5, p. 133-137, 1995.

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

ARAÚJO, A.; JANSEN, A.M.; FERREIRA, L.F. Paleoparasitology of Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 9-16, 2009.

ARAÚJO-JORGE, T.C. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 441-462, 1989.

BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.L. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Structure and Function**, v. 20, p. 275-284, 1995.

BAUM, B.; KUNDA, P. Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own. **Current Biology**, v. 15, p. 305–308, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye Binding. **Analytical**

Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 175 – 200, 1995.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells,” **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 5172–5180, 1995.

BUSCAGLIA, C. A.; CAMPO, V.A.; FRASCH, A.C.; DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Review Microbiology**, v. 4, p. 229-36, 2006.

CARABEO, R.A.; DOOLEY, C.A.; GRIESHABER, S.S.; HACKSTADT, T. Rac interacts with Abi-1 and WAVE2 to promote an Arp2/3-dependent actin recruitment during chlamydial invasion. **Cell of Microbiology**, v. 9, p. 2278–2288, 2007.

CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. **Cell Structure and Function**, v. 14: p. 383-92, 1989.

CAZZULO, J.J.; CAZZULO FRANKE, M.C.; MARTINEZ, J.; FRANKE DE CAZZULO, B.M. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1037, p. 186–191, 1990.

CESTARI, I.S. *Trypanosoma cruzi* e o sistema complemento: mecanismos de ativação e o papel do gene Crit (Complement C2 Inhibitor Trispanning) na resistência à lise em cepas de Classe I e II. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

CHAGAS, C. “Nova tripanosomíase humana :Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem”. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159 -258, 1909.

CHOI, C. H.; THOMASON, P.A., ZAKI,M.; INSALL, R.; BARBER, A. L. Phosphorylation of Actin-related Protein 2 (Arp2) Is Required for Normal Development and cAMP Chemotaxis in *Dictyostelium* **Journal of Biological Chemistry**, v. 288,p. 2464-2474, 2013.

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 and Infections**, v. 8, p. 1502–1512, 2006.

COVARRUBIAS, C.; CORTEZ, M.; FERREIRA, D.; YOSHIDA, N. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p. 1609-1616, 2007.

DAYEL, M.J.; HOLLERAN, E.A.; MULLINS, R.D. Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 14871–14876, 2001.

DE PABLOS, L. M.; GONZÁLEZ, G.G.; SOLANO PARADA, J.; SECO HIDALGO, V.; DÍAZ LOZANO, I.M.; GÓMEZ SAMBLÁS, M.M.; CRUZ BUSTOS, T.; OSUNA, A. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 3993-4001, 2011.

DE SOUZA W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, v. 86, p.197-283, 1984.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T.M.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1-18, 2010.

DIAS, J.C.; AMATO, N. V.; LUNA, E.J. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, p. 375-379, 2011.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, . Cap 5, p.48-71, 2000.

DIOTAIUTI, L. Triatomine-vector of *Trypanosoma cruzi* infection. Emerging Chagas Disease. TEIXEIRA, A. R., VINAUD, M.C., CASTRO, A.M. New York, NY: **Bentham Science Publishers**, 2009.

DOCAMPO R., SCOTT, D.A., VERCESI A.E. e MORENO S.N.J. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biochemistry**, v. 310, p.1005–1012, 1995.

DOOLITTLE, L. K.; ROSEN, M. K.; PADRICK, S. B. Purification of Arp2/3 Complex from *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in Molecular Biology**, v. 1046, p 251-271, 2013.

ELWELL, C.A.; CEESAY, A.; KIM, J.H.; KALMAN, D.; ENGEL, J.N. RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in *Chlamydia trachomatis* entry. **PLoS Pathogen**, v. 4, e1000021, 2008.

FATY, M.; FINK, M.; BARRAL, Y. Septins: a ring to part mother and daughter. **Current Genetics**, v.41, p. 123-131, 2002

FERNANDES, M.C.; FLANNERY, A.R.; ANDREWS, N.; MORTARA, R.A. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**, v. 15, p. 977–991, 2013.

FERREIRA, D.; CORTEZ, M.; ATAYDE, V.D.; YOSHIDA, N. Actin cytoskeleton-dependent and independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5522–5528, 2006.

FIOCRUZ (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ). Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=26> Acesso em: 02/08/2013

FRANCIS, C.L.; RYAN, T.A.; JONES, B.D.; SMITH, S.J., FALKOW, S. Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria, **Nature**, v. 364, p. 639-642, 1993.

GOLEY, E.D.; WELCH, M.D. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 713–726, 2006.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S., VENDEVILLE, S. “*Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes,” **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47078–47086, 2001

HAGLUND, C.M.; WELCH, M.D. Pathogens and polymers: Microbe–host interactions illuminate the cytoskeleton. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, p. 7-17, 2011.

HALL, P. A.; JUNG, K.; HILLAN, K. J.; RUSSELL, S. E. Expression profiling the human septin gene family. **The Journal of Pathology**, v.3, p.269-78, 2005.

HALL, P. A.; RUSSELL, S. E. The pathobiology of the septin gene family. **The Journal of Pathology**, v.4, p.489-505, 2004.

HÄNISCH, J.; KOLM, R.; WOZNICZKA, M.; BUMANN, D.; ROTTNER, K.; STRADAL, T.E. Activation of a RhoA/myosin II-dependent but Arp2/3 complex-independent pathway facilitates *Salmonella* invasion. **Cell Host Microbe**, v.9, p. 273–285, 2011.

HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. **Experimental Cell Research**, v.2, p.265-276, 1971.

HAYWARD, R.D.; KORONAKIS, V. Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. **The Embo Journal**, v.18, p. 4926–4934, 1999.

HERNÁNDEZ-OSORIO, L.A.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L.E.; BALLESTEROS-RODEA, G.; MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; MANNING-CELA, R.G. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p.1-10, 2010.

HIGGS, H.N.; POLLARD, T.D. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 649–676, 2001.

HOLLINGSWORTH, M. A.; SWANSON, B. J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. **Nature Review Cancer**, v.4, p. 45–60, 2004.

INSALL, R. H., MACHESKY, L.M. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. **Developmental Cell**, v. 17, p. 310–322, 2009.

JOHNSTON, S.A.; MAY, R.C. The Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* Escapes Macrophages by a Phagosome Emptying Mechanism That Is Inhibited by Arp2/3 Complex-Mediated Actin Polymerisation. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, 2010.

KIM, S.; COULOMBE, P.A. Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 75-81, 2010.

KINOSHITA, M. Assembly of mammalian septins. **The Journal of Biochemistry**, v.4, p.491-496, 2003.

KINOSHITA, M.; KUMAR, S.; MIZOGUCHI, A.; IDE, C.; KINOSHITA, A.; HARA GUCHI, T.; HIRAOKA, Y.; NODA, M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. **Genes & Development**, v. 11, p.1535–1547, 1997.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology Today**, v. 16, p. 381-387, 2000.

KOVAR, D.R. Molecular details of formin-mediated actin assembly. **Currenty Opinion Cell Biology**, v. 18, p. 11–17, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-85, 1970.

LOCKSLEY, R.M., KILLEEN, N., LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487–501, 2001.

MACARA, I. G.; BALDARELLI, R.; FIELD, C. M.; GLOTZER, M.; HAYASHI, Y.; HSU, S. C.; KENNEDY, M. B.; KINOSHITA, M.; LONGTINE, M.; LOW, C.; MALTAIS, L. J.; MCKENZIE, L.; MITCHISON, T. J.; NISHIKAWA, T.; NODA, M.; PETTY, E. M.; PEIFER, M.; PRINGLE, J. R.; ROBINSON, P. J.; ROTH, D.; RUSSELL, S. E.; STUHLMANN, H.; TANAKA, M.; TANAKA, T.; TRIMBLE, W. S.; WARE, J.; ZELEZNIK-LE, N. J.; ZIEGER, B. Mammalian septins nomenclature, **Molecular Biology of the Cell**, v.12, p.4111-4113, 2002.

MAEDA, F.Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Microbial Immunology**, v. 3, p 312, 2012.

MANDACARU, S. C. **Análise de proteínas nucleares reguladas na amastigogênese e de complexos proteicos de *Trypanosoma cruzi***. 2013.92f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular da Universidade de Brasília) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MARTINEZ, J.J.; COSSART, P. Early signaling events involved in the entry of *Rickettsia conorii* into mammalian cells. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 5097–5106, 2004.

MARTINS, F.A. **Estudos biológicos da proteína P21-His₆ baseada na P21 nativa de *Trypanosoma cruzi* e seu papel na multiplicação parasitária sob diferentes estímulos** . 2013. Monografia (Monografia pelo Instituto de Biologia curso de Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MARTINS,R.M.; ALVES,R.M.; MACEDO, S.; YOSHIDA,N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cellular Microbiology**, v. 13, p. 943–954, 2011.

MATTOS, E.C.; SCHUMACHER, R. I.; COLLI, W.; ALVES, M.J. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Fibronectin or Laminin Modifies Tubulin and Paraflagellar Rod Protein Phosphorylation. **Plos one**, v. 7, p 1-11, 2012.

MAYA, J. D; CASSELS, B. K; ITURRIAGA-VASQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FÁUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode Of action of

natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host (Review) **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 601-620, 2006.

MCCABE, R.E.; REMINGTON, J.S.; ARAÚJO, F.G. Mechanism of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 46, p. 372-376, 1984.

MEIRELLES, M.N.; ARAÚJO JORGE, T.C.; SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v.68, p.7-14, 1982.

MEIRELLES, M.N.L.; ARAÚJO-JORGE, T.C. In: Interação do *Trypanosoma cruzi* com Células Hospedeiras: Estudos *In Vitro*. **Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000. Cap.18, p. 289.

MEIRELLES, M.N.L.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; MIRANDA, C.F.; DE SOUZA, W. & BARBOSA, H.S. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: Ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. **European Journal of Cell Biology**, v. 41, p. 198-206, 1986.

MEIRELLES, M.N.L.; SOUTO-PADRON, T.C. & DE SOUZA, W. Participation of the cell surface anionic sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. **Journal Submicroscopic Cytology & Pathology**, v. 16, p. 533-545, 1984.

MERCER, J.; HELENIUS, A. Virus entry by macropinocytosis, controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus, **The Journal of Experimental Medicine**,.

MILES, M.A., SOUZA, A.A., POVOA, M., SHAW, J.J., LAINSON, R., TOYE, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-821, 1978.

MINEO, J. R. Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. Uberlândia: Edufu, 273 p., 2005.

MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology**, v.73, p.1-14, 1991.

MORTARA, R.M.; ANDREOLI, W.K.; TANIWAKI, N.N.; FERNANDES, A.B.; SILVA, C.V.; FERNANDES, M.C.D.C.; L'ABBATE, C.; SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 7-94, 2005.

MORTARA, RA. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 1-14, 1991

MOSTOWY, S.; COSSART, P. Autophagy and the cytoskeleton: New links revealed by intracellular pathogens. **Autophagy**, v. 7, p. 780-782, 2011.

MOSTOWY, S.; BONAZZI, M.; HAMON, M.A.; THAM, T.N.; MALLET, A.; LELEK, M.; GOUIN, EDITH; DEMANGEL, C.; BROSCHE, R.; ZIMMER, C.; SARTORI, A.; KINOSHITA, M.; LECUIT, M.; COSSART, P. Entrapment of Intracytosolic Bacteria by Septin Cage-like Structures, **Cell Host & Microbe**, v. 8, p. 433-444, 2010.

MOSTOWY, S.; NAM THAM, T.; DANCKAERT, A.; GUADAGNINI, S.; BOISSON-DUPUIS, S.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Septins regulate bacterial entry into host cells. **PLoS ONE**, v.4, p. 4196, 2009.

MULLINS, R.D.; HEUSER, J.A.; POLLARD, T.D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p.6181–6186, 1998.

NATHAN, C.; NOGUEIRA, N.; JUANGBHANICH, C.; ELLIS, J. & COHN, Z. Activation of macrophages in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Experimental Medicine**, v.149, p.1056-1068, 1979.

NOGUEIRA, N.; COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.1, p.1402–1420, 1976.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, p. 26-49, 2009.

OSUNA, A.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; RUIZ-PEREZ, L.M. Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. **International Journal for Parasitology**, v. 16, p. 629-32, 1986.

PAN, F.; MALMBERG, R. L.; MOMANY, M. Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p.103, 2007.

PATTERSON, B. D. Accumulating knowledge on the dimensions of biodiversity: systematic perspectives on neotropical mammals. **Biodiversity Letters**, v. 2, p. 8, 1994.

PEREIRA, P.C.M.; NAVARRO, E.C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Disease**; v. 19,p. 34, 2013.

PETCHAMPAL, N.; SUNYAKUMTHORN, P.; GUILLOTTE, M.L.; VERHOEVE, V.I.; BANAJEE, K.H.; KEARNEY, M.T.; MACALUSO, K.R. Novel Identification of *Dermacentor variabilis* Arp2/3 Complex and Its Role in Rickettsial Infection of the Arthropod Vector. **PLoS One**, v. 9, e93768, 2014.

PETHERICK, A. Chagas disease in the Chaco. **Nature**, v. 465, p. 18-20, 2010.

PIELAGE, J.F.; POWELL, K.R.; KALMAN, D.; ENGEL, J.N. RNAi screen reveals an Abl kinase-dependent host cell pathway involved in *Pseudomonas aeruginosa* internalization. **PLoS Pathogenes**, v. 4, e1000031, 2008.

POLLARD, T.D.; BELTZNER, C.C. Structure and function of the Arp2/3 complex. **Current Opinion of Structure Biology**, v 12, p. 768–774, 2002.

POLLARD, T.D.; COOPER, J.A. Actin, a central player in cell shape and movement. **Science**, v. 326, p. 1208–1212, 2009.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 92 -100, 2001.

PROCÓPIO, D.O.; SILVA, S.; CUNNINGHAM, C.C.; MORTARA, R.A. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 1-13, 1998.

RASSI JUNIOR, A.; DIAS, J. C.; MARIM NETO, J.A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas disease. **Heart**, v. 95, p. 524-534, 2009.

REED, S.C.; SERIO, A.W.; WELCH, M.D. *Rickettsia parkeri* invasion of diverse host cells involves an Arp2/3 complex, WAVE complex and Rho-family GTPase-dependent pathway. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 529-545, 2012.

RÊGO, S.F.M. Sobre o encontro de formas tissulares do *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) no sangue circulante de camundongo branco (*Mus musculus*). **Folia Clinica Biologica**, v. 26, p. 17-45, 1956.

REY, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 856p.

RODRIGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M.G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **Journal of the Cell Biology**, v. 134, p. 349-362, 1996.

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE, T. M.; SANTOS, M. A.; MACHADO, F. C.; GOMES, R. G. B.; MOREIRA, H. H. T.; CRUZ, M. C.; BRÍGIDO, P. C.; SANTOS, P. C. F.; MARTINS, F. A.; BAHIA, D.; MARICATO, J. T.; JANINI, L. M. R.; REBOREDO, E. H.; MORTARA, R. A.; SILVA, C. V. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis, **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012.

ROSESTOLATO, C.T.; DUTRA, J.M.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T.M. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells, **Cell Structure and Function**., v. 27, p. 91-98 2002.

ROTTY, J.D.; WU, C.; BEAR, J.E. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. **Nature Review of Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 7–12, 2013.

SANTANA, J.M.; GRELLIER, P.; SCHRÉVEL, J.; TEIXEIRA, A.R.L. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 129–137, 1997.

SANTELLO, F.H. **Efeito de administração de melatonina oral na evolução da doença de chagas experimental em ratos wistar infectados com a cepa y de *Trypanosoma cruzi***. 2005. Dissertação (Mestrado programa de Pós-Graduação de Biociências Aplicadas a Farmácia) - Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2005.

SANTOS, M.A.; TEIXEIRA, F.B.; MOREIRA, H.H.T.; RODRIGUES, A.A.; MACHADO, F.C.; CLEMENTE, T.M.; BRIGIDO, P.C.; TAVARES, R.; PURCINO, C.; GOMES, R.G.B.; BAHIA,D.; MORTARA, R.A.; MUNTE, C.E.; HORJALES, E.; SILVA, C.V. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 4259, 2014.

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R. A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Journal of Cell Science**, v.101, p. 895-905, 1992.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 3, p.21-40.

SHINODA, T.; ITO, H.; SUDO, K.; IWAMOTO, I.; MORISHITA, R.; NAGATA, K. Septin 14 Is Involved in Cortical Neuronal Migration via Interaction with Septin 4. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 1324-1334, 2010.

SHOJI, K.; OHASHI, K.; SAMPEI, K.; OIKAWA, M.; MIZUNO, K. Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin interaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 424, p. 52-57, 2012.

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIONVANNA, B. ; CRUZ, M. C.; DA SILVA, E. A.; SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M. R. S.; ANDREWS, N. W.; MORTARA, R. A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-570, 2009.

SOUZA, W. A. Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 17-36, 1999.

SOUSA, S.; CABANES, D.; BOUGNÈRES, L.; LECUIT, M.; SANSONETTI, P.; et al. Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells. **Cell of Microbiology**, v. 9, p. 2629–2643, 2007.

STROSCHEIN-STEVENSON, S.L.; FOLEY, E.; O'FARRELL, P.H.; JOHNSON, A.D. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. **PLoS Biology**, v. 4: e4, 2005.

TALIAFERRO, W.; PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Infection Disease**, v. 96, p. 199-26, 1955.

TANAKA, M.; TANAKA, T.; KIJIMA, H.; ITOH, J.; MATSUDA, T.; HORI, S.; YAMAMOTO, M. Characterization of tissue- and cell-type-specific expression of a novel human septin family gene, Bradeion. **Biochemistry Biophysical Research of Community**, v.3, p. 547-553, 2001.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Chagas' disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 400-419, 1992.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease-a review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 463-91, 2006.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetically, taxonomic and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, p. 277-292, 1988.

UNSWORTH, K.E.; WAY, M.; MCNIVEN, M.; MACHESKY, L.; HOLDEN, D.W. Analysis of the mechanisms of *Salmonella*-induced actin assembly during invasion of host cells and intracellular replication. **Cell of Microbiology**, v. 6, p. 1041–1055, 2004.

VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES, S. Jr; MOREIRA, M.C.; FILHO, G.B.; PENA, S.D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **American Journal Pathology**, v. 156, p. 1805-1809, 2000.

VALLEJO, M.C.; NAKAYASU, E.S.; MATSUO, A.L.; SOBREIRA, T.J.; LONGO, L.V.; GANIKO, L.; ALMEIDA, I.C.; PUCCIA, R. Vesicle and vesicle-free extracellular proteome of *Paracoccidioides brasiliensis*: comparative analysis with other pathogenic fungi. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p.1676-1685, 2012.

VILLALTA, F.; SMITH, C.M.; RUIZ-RUAN, A.; LIMA, M.F. A ligand that *Trypanosoma cruzi* uses to bind to mammalian cells to initiate infection. **FEBS Letter**, v. 505, p. 383-388, 2001.

VILLALTA, F.; MADISON, M.N.; KLESHCHENKO, Y.Y.; NDE, P.P.; LIMA, M.F. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in bioscience**, v. 13, p. 3714-3734, 2008.

WATARAI, M.; DERRE, I.; KIRBY, J.; GROWNEY, J.D.; DIETRICH, W.F. *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway. **The Journal of Experimental.Medicine**, v. 194 , p. 1081-1096, 2001.

WEIRICH, C.S.; ERZBERGER, J.P.; BARRAL, Y. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v.6, p. 478-489, 2008.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). The World Health Report 2002: reducing Risk, Promoting Healthy Life. **World Health Organization**, 2002.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Control of Chagas' disease. WHO Geneva:WHO, **World Health Organization**, 1991.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) Chagas disease (american trypanosomiasis) fact sheet (revised in june 2010). **Weekly Epidemiological Record**, v. 34, p 334-346, 2010.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**, 2011.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). WHO factsheet for Chagas' disease. **World Health Organization**, 2012.

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 40, p. 836-839, 1983.

YOSHIDA, N.; MORTARA, R.M.; ARAGUTH, M.F.; GONZALEZ, J.C; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 1663-1667, 1989.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* cell invasion mechanisms. In: World Class Parasites: American Trypanosomiasis. TYLER, K.M., MILES, M.A. (Eds), **Kluwer Academic Publishers**, v. 7, p. 69–79, 2003.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 87-111, 2006.

YOSHIDA, N.; CORTEZ, M. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. **Subcell Biochemistry**, v. 47, p. 82-91, 2008.

ZHOU, D.; MOOSEKER, M.S.; GALÁN, J.E. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. **Science**, v. 283, p. 2092–2095, 1999.

ZIEGER, B.; TRAN, H.; HAINMANN, I.; WUNDERLE, D.; ZGAGA-GRIESZ, A.; BLASER, S.; WARE, J. Characterization and expression analysis of two human septin genes, PNUTL1 and PNUTL2. **Gene**, v.2, p. 197-203, 2000.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, O.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES MA, ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC. M; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting

recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with host cells. **Currents Tropics Microbiology Immunology**, v. 117, p. 129-152, 1985.