

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de *Trypanosoma cruzi*

Priscila Castro Cordeiro Fernandes

Uberlândia-MG
Outubro-2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas como parte de
requisito para obtenção do título de Mestre

Priscila Castro Cordeiro Fernandes
Professor Doutor Cláudio Vieira da Silva (Orientador)

Uberlândia-MG
Outubro-2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
E-Mail: coipa@ufu.br - Telefax: www.imunoparasito.ufu.br (041)3215-2333
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



Prisilla Castro Cordeiro Fernandes

Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 28 de outubro de 2013.

Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes - UFRN

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva - ICBIMUFU

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva (orientador) - ICBIMUFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F363e
2014 Fernandes, Priscila Castro Cordeiro, 1989-
 Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de
 cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de *Trypanosoma cruzi* / Priscila Castro Cordeiro Fernandes. – 2014.
 49 p. : il.

 Orientador: Cláudio Vieira da Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.

 1. Imunologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Chagas,
 Doença de - Teses. I. Silva, Cláudio Vieira da. II. Universidade Federal
 de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória e Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre estar comigo e me permitir a presença de meu anjo protetor.

Aos meus queridos pais, que conseguem me impressionar a cada dia, minha mãe como meu refúgio e fonte de sabedoria, meu pai como meu suporte, mesmo que inesperado, são pessoas lindas as quais admiro muito.

Aos meus irmãos, tão diferentes de mim e que me completam, minha irmã pelo exemplo de paciência e por ter nos dado nosso anjinho, Luiza; meu irmão...bem, não há como descrever pelo que agradeço a sua presença em minha vida.

Aos amigos... que tenho a honra de dizer que são muitos, já que consegui, com muita sorte, desde pequena conviver com pessoas iluminadas, sendo o ciclo repleto de amizades antigas e novas, mas todas verdadeiras. Cito alguns nomes que não poderia deixar, como a Marília(Ximba), Bruna (Burna), Lucas e Priscilla, que estão a tantos anos comigo, obrigada pela paciência, apoio e compreensão.

Aos principais amigos conquistados na graduação, principalmente, à Ana Luiza (que se faz presente mesmo a distância), Guilherme e Daiane (à Helena, que estará conosco daqui algumas semanas, mas já ilumina nossos corações).

Ah... como não falar da família LATRI? Esta que me acolheu com tanto carinho, aos meus queridos e mais próximos, Núbia, Ana Clara, Marlus, Adele, Rebecca, Paula, João Paulo, Bruna, Ana Flávia, Samuca, Aline, Fabricio, Amandita, Tháise, PC, Karine, Cecílio, Célio, Fabiana e por último e mais importante, ao Mestre, Professor Cláudio, que me deu a grande oportunidade, confiando e apoiando, eu não poderia estar mais feliz e grata.

Aos membros da comunidade científica que me auxiliaram, Lourenço (a quem devo o icentivo à pesquisa desde o terceiro período de faculdade), ao Professor Marcelo (pela paciência e colaboração), ao Professor Paulo (que mesmo a distancia nos ajudou muito), às secretárias Lucélia e Luceleide (sempre me ajudando).

Aos colegas de mestrado, por compartilharem os momentos mais difíceis desta etapa e por auxiliarem sempre que possível;

À Universidade Federal de Uberlândia, por nos proporcionar este programa de Pós-graduação, e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que este trabalho se concretizasse.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIACÕES

AE	Amastigotas Extracelulares
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> - Meio de cultura de células
DTU	<i>discrete typing units</i>
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-12	Interleucina-12
kDa	Kilo Dalton
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> "
mL	Mililitro
μ l	Microlitro
μ g	Micrograma
NK	Celulas " <i>Natural Killer</i> "
NO	Oxido nítrico
P21-His6	Proteina recombinante de P21 com cauda de seis histidinas
PI3-K	PI3-quinase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SFB	Soro Fetal Bovino
TCT	Tripomastigota de cultura de Tecido

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1.0 INTRODUÇÃO	06
1.1 Considerações Gerais	06
1.2 Ciclo Biológico de <i>T. cruzi</i>	07
1.3 Apresentação clínica da Doença de Chagas	08
1.4 Relação da diversidade genética e grupos de <i>T. cruzi</i>	09
1.5 Componentes do parasita associados à invasão celular	11
1.6 O citoesqueleto da célula hospedeira na infecção por <i>T. cruzi</i>	16
2.0 JUSTIFICATIVA	19
3.0 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4.0 METODOLOGIA	21
4.1 Cultura celular	21
4.2 Parasitas	21
4.2.1 Cepas	21
4.2.2 Epimastigotas	21
4.2.3 Tripomastigotas de cultura	21
4.2.4 Amastigotas extracelulares	21
4.3 Extração do RNA	22
4.4 Geração de cDNA	23
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR)	23
4.6 Análise Estatística	24
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.0 CONCLUSÃO	30
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

A doença de Chagas foi descrita a um século atrás, sendo ainda endêmica em 21 países e sabe-se que o parasita causador, *Trypanosoma cruzi* caracteriza-se morfológicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Seu ciclo biológico é heteroxênico e a infecção por *T. cruzi* possui apresentação clínica variável, tendo a fase aguda e crônica. Este parasita possui um padrão de evolução reticulado, com predomínio de propagação clonal e eventos ocasionais de recombinação genética, que originam linhagens híbridas. Assim, foram realizados vários estudos baseados na análise do perfil eletroforético que determinaram grupos de cepas deste parasita com características semelhantes, denominados zimodemas, assim, chegou-se a determinação de seis zimodemas ou DTUs (*T. cruzi* I-VI), no nosso caso, utilizamos as cepas G (TcI), Y (TcII), RN-19 (TcIII) e CL (TcVI). Em relação a invasão celular, sabe-se hoje que a polimerização do citoesqueleto de actina é fundamental para a permanência dos parasitas internalizados bem como para a fusão destes a lisossomos e dentre o arsenal de moléculas envolvidas na invasão celular pelas diferentes formas infectantes do *T. cruzi*, temos a P21, uma proteína secretada que tem sua atividade dependente de PI3-quinase. A P21 possui dois alelos de tamanhos diferentes, sendo o alelo menor, “Esmeraldo-like” (TcII) e o alelo maior, “non-Esmeraldo-like” (TcIII). Nosso estudo teve como objetivo analisar a expressão dos alelos da P21 em várias cepas e formas de DTUs diferentes. Assim, utilizamos iniciadores para os dois alelos e realizamos o PCR em tempo real. Obtivemos que, apesar dos alelos representarem TcII e TcIII, foram altamente expressos por todas as formas das cepas G (TcI) e Y (TcII) e a P21 foi mais expressa em cepas tidas como “pouco virulentas” (RN-19 e G), demonstrando que sua expressão não está relacionada a maior virulência.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, P21, Doença de Chagas, DTU

ABSTRACT

Chagas disease was first described a century ago, is still endemic in 21 countries and it is known that the causative parasite, *Trypanosoma cruzi* is characterized morphologically by presenting three distinct evolutionary stages: epimastigote, trypomastigote and amastigote. Its life cycle is heteroxenic and infection by *T. cruzi* has a variable clinical presentation with acute and chronic. This parasite has a pattern of evolution reticulated, with a predominance of clonal propagation and occasional events of genetic recombination, which originate hybrid strains. Thus, we performed several studies based on the electrophoretic profile that determined groups of strains of this parasite with similar characteristics, called zymodemes, well, it was the determination of six zymodemes or DTUs (*T. cruzi* I- VI), in our case, use strains G (TcI), Y (TcII), RN-19 (TcIII) and CL (TcVI). With respect to cell invasion, it is known that the polymerization of the actin cytoskeleton is essential for remaining parasites as well as the internalized fusion of lysosomes and among the arsenal of molecules involved in cell invasion by different infectious forms of *T. cruzi*, we have the P21, a secreted protein that has a dependent activity of PI3-kinase. The P21 has two alleles of different sizes, and the minor allele, "Esmeraldo-like" (TcII) and the higher allele, "non-Esmeraldo-like" (TcIII). Our study aimed to analyze the expression of alleles of P21 in different strains and different forms of DTUs. Thus, we used primers for the two alleles and performed real time PCR. We obtained that despite alleles represent TcII and TcIII, were highly expressed in all forms of strains G (TcI) and Y (TcII) and P21 expression was higher in strains taken as "little virulent" (RN-19 and G), demonstrating that its expression is not related to increased virulence.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, P21, Chagas disease, DTU.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Um século atrás, Carlos Chagas descreveu os sintomas da doença de Chagas, o agente causador e seu vetor. Este pesquisador deparou-se com o parasita *Trypanosoma cruzi*, capaz de causar a infecção quando realizava um estudo de campo sobre casos de malária em Minas Gerais, e observou que este era capaz de causar infecção em seres humanos e animais domésticos (CHAGAS, 1909).

A doença é endêmica em 21 países e continua a representar uma ameaça para a saúde de um número estimado de 28 milhões de pessoas, principalmente na América Latina (RAMOS et al, 2011; OMS, 2005). Atualmente, o número de pessoas infectadas é estimado em 7,7 milhões (RAMOS et al, 2011). Um número significativo de pessoas infectadas é detectado nos Estados Unidos (>300.000), Canadá (>5.500), Europa e Pacífico Ocidental (>80.000), Japão (>3.000), e Austrália (>1.500) (SCHMUNIS, 2007; 2010; TANOWITZ et al, 2011). A doença de Chagas é uma zoonose complexa que durante os últimos anos vem ocorrendo fora da América Latina, transmitida de uma forma não-vetorial devido à migração de pessoas provenientes de zonas endêmicas para áreas consideradas não endêmicas (DE AYALA, 2009).

T. cruzi pertence à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e caracteriza-se morfológicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento de um estágio a outro é um processo complexo, envolvendo mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984). Esse protozoário flagelado apesar de descoberto há pouco mais de 100 anos, teve seu DNA identificado em múmias de aproximadamente 9 mil anos nos desertos do Peru e Chile (AUFDERHEIDE et al., 2004).

Além da diferença na distribuição geográfica dos hospedeiros vertebrados e dos triatomíneos (vetores da doença pertencentes da subfamília Triatominae e Família Reduviidae), existe a preferência desses vetores por fontes de alimentos que definem dois diferentes ciclos de transmissão de *T. cruzi*: o ciclo silvestre e o doméstico/peridoméstico (WHO, 2002). No ciclo silvestre, parece haver um balanço ecológico entre o parasito, seus vetores e hospedeiros (BARRETO, 1979), enquanto que

o ciclo doméstico resulta do contato entre o homem e o vetor, provocado por modificações ecológicas e sociais no ambiente (DIAS, 1987).

Além do mecanismo vetorial, a transmissão da doença de Chagas pode ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, em acidentes laboratoriais, após transplante de órgãos, pelo leite materno e por via oral através de alimentos contaminados (YOSHIDA, 2008; DIAS, 2009).

1.2 Ciclo Biológico de *T. cruzi*

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico, envolvendo uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (mamíferos de várias espécies, incluindo o homem) e uma fase extracelular no hospedeiro invertebrado (vetor), representado por insetos hemípteros, hematófagos da Subfamília Triatominae. O ciclo inicia-se quando o inseto vetor, ao sugar o sangue dos mamíferos infectados com *T. cruzi*, ingere formas tripomastigotas sanguíneas (formas flageladas fusiformes) que no estômago do vetor transformam-se em epimastigotas (aflageladas) e passam para o intestino delgado, onde sofrem intensas multiplicações e posteriormente se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicos (infectantes) no reto. Ao fazer o repasto sanguíneo em um novo animal, o triatomíneo elimina estas formas infectantes juntamente com suas fezes e urina. Assim, quando o animal coça o local da picada acaba ulcerando a pele e facilitando a penetração das formas infectantes do parasito (VIANNA, 1911, DELANOE, 1912; MAYER, 1914; REGO, 1956).

No sangue dos mamíferos, os tripomastigotas metacíclicos invadem vários tipos celulares formando um vacúolo parasitóforo intracelular, onde se diferenciam em amastigotas (formas arredondadas e sem flagelo externo) que entram em processo de replicação e após romperem a membrana do vacúolo iniciam reprodução assexuada por divisão binária, e, depois de cerca de cinco dias, diferenciam-se em tripomastigotas que são liberados no interstício após a lise da célula infectada. Uma vez livre no interstício, essas formas tripomastigotas sanguíneas, podem então invadir novos macrófagos ou células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ainda ingeridos por outro triatomíneo durante seu repasto sanguíneo (DE SOUZA, 2000; MORTARA et al., 2008; RASSI; RASSI Jr., 2008; HERNANDEZ-OSORIO et al., 2010).

A existência de um sub-ciclo alternativo foi descrita envolvendo formas amastigotas no hospedeiro mamífero originárias da lise prematura das células infectadas, designadas amastigotas intracelulares (HUDSON, 1984; DE CARVALHO; DE SOUZA, 1984) ou por amastigotas extracelulares (AE) decorrentes da diferenciação extracelular de tripomastigotas, sendo estas formas capazes de invadir células fagocíticas e não fagocíticas (PAN, 1978; LEY et al., 1988; MORTARA, 1991; ALVES; MORTARA, 2009). Essa capacidade das formas amastigotas em invadir células tem sido compreendida como um modo alternativo de propagação do ciclo do parasito que auxilia na sobrevivência do mesmo no hospedeiro vertebrado (REGO, 1956; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

1.3 Apresentação clínica da Doença de Chagas

A infecção por *T. cruzi* possui apresentação clínica variável. A fase aguda inicial é caracterizada por parasitemia patente que pode perdurar por 40 a 60 dias. Os sintomas podem ser moderados e atípicos, podendo ser confundidos com os de diversas outras infecções, e conseqüentemente a infecção não é frequentemente reconhecida neste estágio (WHO, 2002). Neste período, as formas amastigotas podem ser vistas no interior de fibras cardíacas, células musculares lisas e esqueléticas, células endoteliais, gliais, macrófagos e fibroblastos. Depois da fase aguda, os pacientes entram na fase crônica da doença, podendo a infecção permanecer na forma indeterminada por vários anos ou persistir indefinidamente.

Este período é caracterizado por ausência de sintomas clínicos relevantes, baixa ou nenhuma parasitemia, mesmo que o paciente permaneça reativo em testes sorológicos de rotina. Durante este longo intervalo, pessoas infectadas vivendo em áreas endêmicas constituem em importantes reservatórios do parasito. Até 20 anos após a infecção, aproximadamente 35% dos pacientes apresentam sinais clínicos característicos da doença de Chagas, como cardiomiopatia, danos no sistema nervoso periférico ou disfunção no trato digestivo frequentemente levando a megacolon e/ou megaesôfago (WHO, 2002).

1.4 Relação da diversidade genética e grupos de *T. cruzi*

T. cruzi apresenta um padrão de evolução reticulada, com predomínio de propagação clonal (em que a progênie é geneticamente idêntica, ou muito semelhante, à linhagem parental) e eventos ocasionais de recombinação genética, que originam linhagens híbridas, estabilizadas, subsequentemente, por propagação clonal (ZINGALES, 2011).

Sabe-se que *T. cruzi* tem a capacidade de realizar trocas genéticas, via um mecanismo pouco usual de fusão nuclear; formação de uma progênie poliplóide, que pode sofrer recombinação entre alelos e que, após perda cromossômica, pode retornar ao estado diplóide. Este processo assemelha-se ao processo parasexual observado em fungos. Estudos forneceram evidências convincentes de que *T. cruzi* é um organismo diplóide, que a reprodução sexual é inexistente e que a estrutura populacional é clonal (HEITMAN, 2006).

Os primeiros estudos de genética de população do parasito basearam-se na análise do perfil eletroforético de seis isoenzimas, historicamente utilizadas para explorar a diversidade genética de microorganismos. Tais estudos revelaram a presença de três grupos principais, denominados zimodemas Z1, Z2 e Z3. Demonstrou-se também que as cepas dos zimodemas Z1 e Z3 estavam associadas ao ciclo silvestre e as de Z2 ao ciclo doméstico (MILES et al., 1978).

Outros estudos que também analisaram perfil isoenzimático de amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes com a Doença de Chagas verificaram a presença de quatro grupos de zimodemas distintos, determinados como ZA, ZB, ZC e ZD (ROMANHA, 1982). Quando comparados os zimodemas Z1, Z2, Z3, ZA, ZB, ZC e ZD, obteve-se que os zimodemas ZA e Z2 possuíam grande similaridade, enquanto que os outros eram bem distintos.

A diversidade genética do parasita foi corroborada por análises de RAPD (“randomly amplified polymorphic DNA”), RFLP (“restriction fragment length polymorphism”), impressões digitais de DNA (“DNA fingerprinting”), microsátélites e cariótipo molecular (ZINGALES et al., 1999). Por outro lado, e conforme esperado dada a natureza destas metodologias baseadas em marcadores genéticos de evolução rápida, tais abordagens não permitiram definir agrupamentos de parasitas que permitissem sua associação com características epidemiológicas (ZINGALES, 2011).

Miles e col. indicaram que dentre esses três grupos principais (zimodemas), uma linhagem era composta principalmente por cepas híbridas, por outras palavras, dois ancestrais (STURM & CAMPBELL, 2010). A identificação de marcadores moleculares como D7 – 24Sa rDNA e genes mini-exon permitiram uma clara distinção entre cepas de *T. cruzi* em dois grandes grupos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (SOUTO et al., 1996; NUNES et al., 1997).

Dentro de cada linhagem, os isolados apresentam 98-100% de similaridade da sequência do domínio D7 do LSU rDNA, ao passo que entre as linhagens a similaridade é de aproximadamente 80% (SOUTO et al., 1996). Isto sugere que a divergência entre as linhagens *T. cruzi* I e *T. cruzi* II ocorreu antes da divergência entre os isolados (isto é, que as linhagens são monofiléticas) (ZINGALES, 2011).

A genotipagem de isolados de reservatórios silvestres e triatomíneos da Mata Atlântica do Rio de Janeiro mostrou que há adaptação preferencial de *T. cruzi* I a gambás e de *T. cruzi* II a primatas. Nos triatomíneos, os dois grupos foram observados (FERNANDES et al., 1999; ZINGALES, 2011).

Baseado em análises com diferentes marcadores genéticos, foi proposta a subdivisão do grupo *T. cruzi* II em cinco subgrupos, denominados TcIIa (CanIII c11), TcIIb (Esmeraldo), TcIIc (M6241 & M5631), TcIId (Bolivian Z2) e TcIIe (CL Brener) (BRISSE et al., 2000; 2001). Recentemente, os grupos foram determinados em seis discretas unidades de tipagem (*discrete typing units– DTU*), onde DTU é definido com um conjunto de isolados que é geneticamente semelhante e que pode ser identificado por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (ZINGALES, 2011) de acordo com seu conteúdo (*background*) genético. Assim, obteve-se TcI (que continuou TcI), TcII (antes subgrupo TcIIb), TcIII (antes subgrupo TcIIc), TcIV (antes subgrupo TcIIa), TcV (antes subgrupo TcIId) e TcVI (antes subgrupo TcIIe) (ZINGALES et al., 2009). A possibilidade de troca genética limitada entre DTUs também está em debate.

Assim, tem-se várias cepas representantes de todos os grupos, como *T. cruzi* I - cepa G (YOSHIDA, 1983), *T. cruzi* II - cepa Y (SILVA & NUSSENSWAIG, 1953), *T. cruzi* III - Reisolado do Rio Grande do Norte (RN-19) (CÂMARA et al., 2010) e *T. cruzi* VI cepa CL, antes pertencente ao grupo II (BRENER; CHIARI, 1963; SOUTO et al., 1996; MACEDO et al., 2004; ZINGALES et al., 2009). Deve ser mencionado que o clone CL Brener, referência do Projeto Genoma de *T. cruzi*, é um organismo híbrido,

que apresenta os dois haplótipos parentais, com uma divergência média de sequência de 5,4% (EL-SAYED et al., 2005; ZINGALES, 2011). Estas cepas apresentam diferentes mecanismos de interação com a célula hospedeira e, portanto, infectividade também diferente (MORTARA et al., 2005; ALVES; MORTARA, 2009).

A distribuição geográfica destes DTUs em humanos indica a prevalência de *T. cruzi* I em pacientes do México, América Central, países do Norte da América do Sul e Amazônia (ZINGALES, 2011). Nestes pacientes são observadas as formas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas (ANEZ et al., 2004; BLACK et al., 2007; MEJIA-JARAMILLO et al., 2009; ESPINOZA et al., 2010).

Para outros países da América do Sul tem-se a prevalência das manifestações cardíaca e digestiva (CARRANZA et al., 2009). Os grupos *T. cruzi* de II a VI são os principais agentes causadores da doença de Chagas no sudeste de partes da América do Sul (ZINGALES et al 2009; DINOIA et al., 2002; FERNANDES et al., 1999). Sendo assim, sabe-se que todas as DTUs são capazes de causar a doença de Chagas em humanos embora haja pouquíssimos relatos da DTU IV em humanos; que *T. cruzi* I não favorece a forma digestiva e que *T. cruzi* II, V e VI aparentemente seriam mais “patogênicas”, promovendo as manifestações cardíaca e digestiva (ZINGALES, 2011).

1.5 Componentes do parasita associados à invasão celular

A adesão de formas tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) à célula hospedeira fixada é um processo ativo que requer energia do parasita e não requer microfilamentos da célula hospedeira intactos (MORTARA, 1991; PROCÓPIO et al., 1998). Estudos demonstraram que durante a invasão celular por TCT ocorre recrutamento e fusão de lisossomos à membrana plasmática da célula hospedeira no sítio de invasão do parasita de maneira dependente de cálcio, o que tem como resultado a formação do vacúolo parasitóforo (BURLEIGH, ANDREWS, 1998; BURLEIGH, WOOLSEY, 2002).

Além disso, sabe-se que a polimerização do citoesqueleto de actina é fundamental para a permanência dos parasitas internalizados bem como para a fusão destes a lisossomos (WOOLSEY, 2004). Neste contexto, verificou-se que a fusão do parasita com lisossomos logo após a invasão é essencial para a retenção intracelular dos parasitas (ANDRADE, 2004). Durante o processo de internalização, o vacúolo

parasitóforo funciona como um centro organizador de microtúbulos. Cerca de duas horas após a infecção, TCTs rompem o vacúolo parasitóforo pela ação de uma hemolisina ativa em pH ácido (ANDREWS, 1989; ANDREWS et al., 1990) e entram no citoplasma, onde se multiplicam livremente como amastigotas (HALL, 1993).

Diante da descrição na literatura da série de componentes envolvidos na invasão celular por tripomastigotas metacíclicos e TCTs e alguns aspectos da invasão por amastigotas extracelulares, podemos visualizar o seguinte cenário em uma infecção *in vivo* tendo como exemplo as cepas G e CL: considerando uma infecção oral, tripomastigotas metacíclicos ao atingir o estômago resistem à degradação devido à proteção exercida pelas mucinas, que são glicoproteínas de 35 e 50 kDa (gp35/50) resistentes à ação de proteases, as quais são abundantes na superfície do parasito. A digestão por pepsina deixa intacto o domínio de uma glicoproteína de 82kDa (gp82) que contém os dois sítios de ligação à célula hospedeira e à mucina gástrica. Ao aderir à mucina gástrica o parasito atravessa o muco para atingir as células epiteliais subjacentes. Uma vez rompida a barreira epitelial, os tripomastigotas metacíclicos da cepa CL invadem eficientemente as células epiteliais da mucosa gástrica mobilizando a gp82 e ativando o sinal de cálcio bidirecional. As formas do parasito da cepa G podem atingir as células epiteliais de forma tão eficiente quanto a CL, mas a invasão pode ser impedida por uma glicoproteína de 90 kDa (gp90). Alguns parasitos (Cepa G) mobilizam a sua internalização por meio da gp35/50. Por outro lado, parasitos deficientes da gp82 e que expressam a gp30 como os isolados 569 e 588, teriam dificuldade em penetrar na camada grossa de mucina, porque a gp30 liga-se fracamente a mucina gástrica (NEIRA et al., 2003; CORTEZ et al., 2003; YOSHIDA, 2006).

Durante o curso da infecção, formas tripomastigotas sanguíneas, em contrapartida às formas TCTs, precisam superar as barreiras impostas pela matriz extracelular antes de atingir a célula alvo. Diante do arsenal de moléculas descritas envolvidas na invasão celular *in vitro* por estas formas, pode-se visualizar o seguinte panorama: através de glicoproteínas de superfície pertencentes à superfamília da transialidase-gp85 o parasito liga-se à fibronectina e à laminina (QUAISSI et al., 1986), abrindo caminho para a ação da enzima POP Tc80, que hidrolisa colágeno (SANTANA et al., 1997; GRELLIER et al., 2001). Ao ligar-se a célula hospedeira através da Tc85 (ALVES et al., 1986), a gp83 (VILLALTA et al., 2001), Tc-1 (AUGUSTINE et al.,

2006) ocorre posteriormente ativação da oligopeptidase B (BURLEIGH, ANDREWS, 1995; CALER et al., 1998) do parasito que gera o fator solúvel agonista de cálcio a partir de um precursor. A ativação da mobilização de cálcio na célula hospedeira a partir deste fator secretado pelo parasito promove a invasão celular. Alternativamente ou simultaneamente, a cruzipaina é secretada pelos TCTs aderidos à célula alvo e sua atividade no cininogênio gera cininas, que também induzem resposta de cálcio ao interagirem com seus receptores (SCHARFSTEIN et al., 2000; TODOROV et al., 2003). Durante este processo, a gp83 secretada pode induzir o aumento na síntese de laminina γ -1 pela célula hospedeira (NDE et al., 2006), bem como o da galectina-3 humana pode aumentar a adesão do parasito à laminina, contribuindo para maior invasão celular. Neste ínterim, células infectadas podem romper-se liberando amastigotas, bem como tripomastigotas sanguíneos presentes na circulação podem transformar-se em amastigotas extracelulares. Estes amastigotas são resistentes à lise pelo sistema complemento (IIDA et al., 1989) e provavelmente têm sua sobrevivência garantida após fagocitose por macrófagos devido à manutenção de um ambiente imunossupressor com atividade de TGF- β e IL-10. Estas citocinas impedem a ativação de macrófagos, permitindo que os amastigotas escapem no citosol e iniciem a multiplicação (SCHARFSTEIN et al., 1999).

Formas amastigotas podem também infectar células não fagocíticas por um mecanismo dependente de actina e assim, por estes mecanismos, contribuir para a perpetuação da doença (PROCÓPIO et al., 1998; 1999). Formas amastigotas podem utilizar epítomos de carboidrato presentes em Ssp-4 para aderirem às proteínas com atividade lectínicas da célula hospedeira (SILVA et al., 2006).

Em relação às enzimas degradantes de fosfolipídios que são associadas às respostas inflamatórias, estudos mostram que as fosfolipases, enzimas lipolíticas, que hidrolisam os fosfolípidos, desempenham um papel crucial em diversos processos bioquímicos e biológicos (DENNIS, 1983). No caso de *T. cruzi*, estão relacionadas principalmente às respostas inflamatórias em torno de ninhos de amastigotas em vários tecidos de pacientes (TAFURI, 1979). Assim, sabe-se que a autólise do parasita libera ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, rapidamente acumulados como consequência da degradação de lipídios endógenos, evidenciando a ação de uma fosfolipase em particular, denominada Fosfolipase A1 (PLA₁) (WAINSZELBAUM, 2001). Esses

lipídios bioativos liberados a partir da lise de amastigotas têm efeito tóxico e essa atividade pode estar envolvida na patogênese da doença (ASAHI, 1986). Além disso, estudos indicam que a PLA₁ está envolvida nos eventos iniciais da interação parasito-célula hospedeira que antecedem a invasão do parasita (BELAUNZARAN, 2007; VILLALTA, 1999).

Um exemplo das famílias de proteínas de superfície de *T. cruzi* é a família de amastinas, que consiste em pequenas proteínas de cerca de 200 aminoácidos, e foi identificada pela primeira vez por sua maior expressão em amastigotas da cepa “Tulahuen” (TEIXEIRA, 1994). Após análise filogenética desta família em tripanossomatídeos, definiu-se quatro subfamílias (α , β , γ e δ), com organização genômica distinta, bem como os padrões de expressão durante o ciclo celular de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (JACKSON, 2010). Assim, as proteínas amastinas parecem operar na interface hospedeiro-parasita e estão envolvidas no prognóstico da doença. Embora sua função exata na progressão da doença ainda não tenha sido determinada, foi levantada a hipótese de que pode desempenhar um papel no tráfego da membrana celular para ajustar o pH sob as condições citoplasmáticas do fagolisossomo (ROCHETTE, 2005; CRUZ, 2012).

Estudos descrevem que o papel intracelular das amastinas em sua forma recombinante seja capaz de aderir às células hospedeiras e de inibir a invasão de células dos mamíferos por *T. cruzi*, sendo que, utilizando-se o parasita de cepa G de forma a superexpressar constitutivamente a δ -amastina, levou à maior diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (CRUZ, 2012).

Dentre o arsenal de moléculas envolvidas na invasão celular pelas diferentes formas infectantes do *T. cruzi*, recentemente caracterizou-se em nosso laboratório novo componente de 21 kDa (P21) que é secretado e está envolvido na invasão celular por amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos. A P21 é uma proteína expressa em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas das cepas G e CL, cuja forma recombinante (P21-His₆) adere a superfície de células HeLa de forma dose-dependente. Anticorpos policlonais desenvolvidos contra His₆-P21 inibiram a invasão celular por formas amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos da cepa G, mas não inibiu a invasão da cepa CL. Por outro lado, a adição da proteína recombinante

30 minutos antes de colocar os parasitos para invadirem, inibiu a invasão por amastigotas extracelulares de ambas as cepas. Quando a proteína foi adicionada às células HeLa ao mesmo tempo em que os amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos, foi verificado um significativo aumento na invasão celular por ambas as formas evolutivas das cepas G e CL (SILVA et al., 2009).

Após a adesão, acredita-se que a P21 (SILVA et al., 2009) é secretada na justaposição parasita-célula hospedeira e ativa uma cascata de sinalização ainda desconhecida que leva a formação de ondas de actina em torno do parasita com ativação da GTPase Rac 1 (FERNANDES, MORTARA, 2004) e recrutamento de microdomínios enriquecidos em colesterol e GM1 na célula hospedeira (FERNANDES et al., 2007) bem como, mobilização de cálcio dos acidocalciosomas e fosforilação de componentes de 87 e 175 kDa no parasito (FERNANDES et al., 2006), culminando com sua internalização.

Além disso, estudos do nosso grupo demonstram que a P21-His₆ recombinante, baseada na proteína nativa, aumenta a fagocitose de partículas de zimosan e protozoários parasitas intracelulares por macrófagos inflamatórios. Tal aumento é devido à indução da via da PI3-kinase por esta proteína e, conseqüentemente, da polimerização de actina (RODRIGUES *et al*, 2012a). A P21-His₆ não tem sua ação específica a *T. cruzi*, mesmo sendo uma proteína exclusiva de tal parasito, sendo capaz de atuar na invasão de patógenos diversos e também está diretamente relacionada com o aumento na polimerização e reestruturação da actina celular em macrófagos tratados em relação aqueles não expostos a mesma, indicando sua possível interferência na remodelação do citoesqueleto celular e, conseqüentemente, na internalização e invasão parasitaria. Sendo que possivelmente, sua atividade seja dependente de PI3-quinase, já que o composto inibidor desta via, em estudos, também foi capaz de inibir a atuação de P21 no citoesqueleto celular. É importante salientar que esses estudos utilizaram a proteína recombinante P21-His₆ em sua forma renovelada (rnP21-His₆), uma vez que estudos recentes demonstraram que a P21 renovelada, possui as mesmas propriedades estruturais e funcionais da P21-His₆ produzida a partir da fração solúvel do lisado bacteriano (sP21-His₆) (SANTOS, 2013).

No genoma do clone CL-Brener a proteína P21 aparece com dois alelos de tamanhos diferentes, sendo que o alelo menor XM_812182 (465bp) é um haplótipo

“Esmeraldo-like” (*T. cruzi* II) e o alelo maior XM_809691 (543bp), é uma sequência non-Esmeraldo-like. Em relação à sua estrutura, no que condiz o “menor pedaço” do alelo maior, é bem parecido com o alelo menor, e não se sabe se a diferença de tamanho é algo que o alelo maior “ganhou” ou se o alelo menor “perdeu” com a evolução. Sabe-se que o alelo menor, conhecido como Esmeraldo-like vem de TcII e o alelo maior, chamado non-Esmeraldo-like de TcIII.

1.6 O citoesqueleto da célula hospedeira na infecção por *T. cruzi*

Células HeLa têm sido bastante utilizadas para estudos de mecanismos de invasão por *T. cruzi*. Nestas células, a invasão por tripomastigotas metacíclicos ocorre pelas bordas celulares (MORTARA, 1991) culminando com a formação de protruções ricas em actina ao redor do parasito (SCHENKMAN; MORTARA, 1992).

Como esse fenômeno não pode ser inibido pela ação da citocalasina D tem-se que esse fenômeno ocorre principalmente em decorrência da ação do parasito (PROCÓPIO et al., 1999). Assim, amastigotas extracelulares (AE) agregam aos filamentos de actina por adesão às microvilosidades da superfície dorsal de células HeLa dando origem à uma estrutura semelhantes à uma taça logo abaixo do parasito com sua conseqüente invasão (MORTARA, 1991). Estes rearranjos do citoesqueleto de actina são controlados por membros da família de Rho GTPase (NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004) como a Rho GTPase Rac 1 que induz a formação de protruções de membrana ricas em actina e está envolvida no processo de invasão celular por amastigotas extracelulares da cepa G (FERNANDES; MORTARA, 2004).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório indicam que proteínas associadas à polimerização de actina desempenham um papel duplo durante a infecção *in vitro* por amastigotas extracelulares das cepas G e CL. *ADP-ribosylation factor 6* (ARF6) pertence à família ARF de pequenas GTPases e atua na regulação do tráfego de membrana e rearranjo do citoesqueleto de actina na membrana plasmática. Ela também atua como mediador de vias endocíticas em que microdomínios de membrana ricos em lipídios podem ou não estar envolvidos. ARF6 teve atividade importante na invasão de *Toxoplasma gondii*, promovendo ativação de PIP3-quinase e mobilização de PIP₂ e PIP₃ para o vacúolo parasitóforo onde também estava presente (SILVA et al., 2009).

Outra molécula envolvida na reorganização da actina em eventos de internalização de patógenos é a anexina A2. A anexina A2 é membro da família de anexinas, proteínas ligantes de fosfolipídios e de F-actina sendo implicadas em uma variedade de respostas celulares à estímulos induzidos pela elevação dos níveis intracelulares de cálcio. Sabe-se que *in vitro*, a anexina A2 está associada com a formação de cometa de actina sendo sua expressão suficiente para ligar filamentos de actina a vesículas contendo PIP₂ o que confere um papel importante desta molécula no tráfego de vesículas dependentes da polimerização de actina. Além disso, a anexina A2 é recrutada para estruturas de membrana em forma de pedestais ricas em actina nos locais de adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica à célula hospedeira. Nestas regiões e em vacúolos envolvidos por actina há mobilização da enzima 1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase (PIP5quinase) mediado por ARF6 ocasionando enriquecimento de PIP₂ e conseqüentemente de anexina A2 (ZODIACK et al., 2002).

Como a ARF6 está envolvida com vias desencadeadas por balsas lipídicas onde a anexina A2 pode estar vinculada pela presença de fosfolipídeos (HAYES et al., 2009) e porque AE de *T. cruzi* pode empregar balsas lipídicas como estratégia para invadir as células (FERNANDES et al., 2007) é possível que estas moléculas participem do processo de invasão de AE. Uma vez internalizados, AE passa a residir em um vacúolo com conseqüente fusão de lisossomos o que indica que há mobilização de tráfego vesicular intracelular (WOOLSEY et al., 2003).

Por outro lado, a ausência de qualquer uma destas proteínas é suficiente para propiciar um ambiente favorável a multiplicação intracelular dos amastigotas. Este resultado sugere a possibilidade de que a polimerização do citoesqueleto de actina durante a infecção por *T. cruzi* possui um papel importante no controle da replicação do parasito e por conseqüente, na propagação da doença (RODRIGUES, 2012b).

Estudos recentes indicam que o tratamento com rnP21-His₆ diminui significativamente a multiplicação de *T. cruzi* dentro das células, além de ser visível a maior polimerização de actina nas células tratadas com rnP21-His₆ (RODRIGUES, 2012b).

As citoqueratinas (CQ) são constituintes do citoesqueleto das células epiteliais, por isso também denominadas queratinas epiteliais. O citoesqueleto, uma rede protéica intracelular, é constituído pelos chamados filamentos intermediários e pelos

microtúbulos, que estão relacionados com o transporte intracelular de organelas, os filamentos de actina participam da motilidade celular, e os filamentos intermediários dão a estrutura tridimensional da célula. A CQ18 associa-se à CQ8, formando o polímero componente do citoesqueleto de células de epitélio simples e de muitos epitélios derivados de neoplasmas (TAMURA et. al., 2000).

A principal função atribuída às citoqueratinas é a de proteção contra o stress mecânico. (FUCHS & CLEVELAND, 1998). Estudos propõem que as CQ e outras proteínas intracelulares podem não ser componentes exclusivos do citoplasma sendo também encontradas na superfície celular e implicadas como receptores para diferentes ligantes plasmáticos, no caso da CQ18, que não tem domínio transmembrânico, foi sugerido que sua apresentação na superfície possa ocorrer em função de sua projeção através da membrana plasmática, como parte de um complexo proteico ou que, secretada pelas células, possa se associar com a porção externa da membrana plasmática.(HEMBROUGH, 1995). A fosforilação de queratinas, incluindo CQ18, é um processo dinâmico que possui papel importante na organização e função de seus filamentos. Além disso, as CQ também são considerados marcadores celulares, sendo também utilizada para diagnosticar carcinomas, no caso do *T. cruzi* (COULOMBE & OMARY, 2002).

2.0 JUSTIFICATIVA

Dentre as abordagens da infecção por *T. cruzi*, o estudo de componentes do parasito e da célula hospedeira durante o processo de invasão celular e multiplicação intracelular se faz de extrema importância para o conhecimento das diversas vias que o patógeno utiliza para promover a infecção. Neste contexto, diferentes cepas e formas infectantes (tripomastigotas sanguíneas e tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) e, amastigotas extracelulares) de *T. cruzi* apresentam distintos níveis de infectividade *in vitro* e *in vivo*, mobilizam diferentes proteínas do parasito, componentes da célula hospedeira e processos de sinalização intracelular. Experimentos *in vitro* realizados por Mortara et al. (1999) relataram que amastigotas extracelulares provenientes da cepa G (*T. cruzi* I), apresentam uma elevada infectividade quando comparadas aos amastigotas da cepa CL (*T. cruzi* VI), cujas formas tripomastigotas são mais infectantes que as da cepa G *in vivo* e *in vitro* (YOSHIDA, 2006).

No genoma do clone CL-Brener a proteína P21 aparece com dois alelos de tamanhos diferentes, sendo que o alelo menor XM_812182 (465bp) é um haplótipo “Esmeraldo-like” (*T. cruzi* II) e o alelo maior XM_809691 (543bp), é uma sequência non-Esmeraldo-like. Assim, compreender a expressão gênica destes alelos é de extrema importância por ser mais uma peça no entendimento dos fatores envolvidos e comportamento de cada cepa/forma em particular na entrada do parasito na célula hospedeira. Assim, podemos verificar se a entrada do parasita na célula está diretamente relacionada ao fator de virulência de cada cepa ou não.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica de ambos os alelos da proteína de 21kDa (P21) nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* provenientes de isolados pertencentes aos diferentes grupos (DTUs I, II, III e VI).

3.2 Objetivo específico

- Quantificar a expressão gênica de 21 kDa (P21) em isolados do *T. cruzi* pertencentes aos diferentes grupos (DTUs I, II, III e VI);

4.0 METODOLOGIA

4.1 Cultura celular

Foram utilizadas células Vero para manutenção do ciclo do *T. cruzi in vitro*, cultivadas na presença de Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) com 10% de soro fetal bovino (SFB 10%), Penicilina (60 mg/L), Gentamicina (40mg/L), Estreptomicina (10 mg/L) e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

4.2 Parasitas

4.2.1 Cepas

Foram utilizadas neste estudo *T. cruzi* I - cepa G (YOSHIDA, 1983), *T. cruzi* II - cepa Y (SILVA & NUSSENSWAIG, 1953), *T. cruzi* III - Reisolado do Rio Grande do Norte (RN-19) (CÂMARA et al., 2010), que foi gentilmente cedida pelo Professor Paulo da Matta Guedes, (Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN) sendo isolada por xenocultura de *Panstrongylus lutzii* adulto do município de Caraúbas, estado do Rio Grande do Norte, cedidos pelas Professoras Lúcia M. C. Galvão e Antônia Cláudia Jácome Câmara do Laboratório de Biologia do *T. cruzi* do Centro de Ciências da Saúde-UFRN; e *T. cruzi* VI cepa CL (BRENER; CHIARI, 1963)

4.2.2 Epimastigotas

As formas epimastigotas dos parasitas das cepas estudadas foram mantidas em meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) (CAMARGO, 1964) suplementado com SFP 10% em tubos de ensaio de 15 ml, contendo 5 ml de meio LIT suplementado a uma temperatura de 28 °C. A cada 30 dias eram feitos repiques com 1 ml de meio com parasito em um novo tubo com 4 ml de meio suplementado para evitar a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos.

4.2.3 Tripomastigotas de cultura

A partir do envelhecimento do meio LIT com epimastigotas para obtermos tripomastigotas metacíclicos, fizemos a infecção de células Vero e com acompanhamento da infecção com eclosão de parasitos, tripomastigotas de cultura foram obtidos através da centrifugação diferencial do sobrenadante recolhido, sendo primeiramente centrifugado a aproximadamente 1500 rpm por 5 minutos e após,

centrifugado este sobrenadante por 4000 rpm por 10 minutos. O pellet contendo no mínimo 5.10^6 parasitos/ml foi ressuscitado com Ribozol.

4.2.4 Amastigotas extracelulares

Recolhemos o sobrenadante da cultura de células VeRo infectadas com tripomastigotas, realizamos centrifugação diferencial e o pellet foi ressuscitado em meio LIT pH 5.8 suplementado com 10% SFB e incubado a 37 °C aproximadamente 16 horas, obtendo, assim, as formas amastigotas extracelulares (Mortara, 1991; Ley *et al.* 1988).

4.3 Extração do RNA

Para epimastigotas, foram realizados repiques a cada três dias e a partir do terceiro repique, centrifugamos aproximadamente 5 ml, sendo utilizado o pellet. Para tripomastigotas de cultura, fizemos centrifugação diferencial de aproximadamente 10 ml de sobrenadante de células infectadas, sendo utilizado o pellet final. Para amastigotas, centrifugamos aproximadamente 5 ml, sendo utilizado o pellet. Cada amostra teve no mínimo uma quantidade de 5.10^6 parasitos por ml, sendo utilizado aproximadamente um ml por amostra.

O RNA das diferentes formas evolutivas de todas as amostras das cepas utilizadas foi extraído e purificado usando kit Ribozol (AMRESCO) de acordo com instruções do fabricante. Sendo cada amostra centrifugada e ressuscitada com 1 ml de Ribozol. Assim, seguimos os seguintes passos:

- ✓ As amostras ressuscitadas com Ribozol foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos;
- ✓ Adicionamos 200 µl de clorofórmio em cada e agitamos o cada tubo por 15 segundos, sendo incubados depois por 3 minutos;
- ✓ Centrifugamos a 120000 rpm durante 15 minutos a 4°C;
- ✓ A fase aquosa presente em cada tubo foi retirada e colocada em novo tubo com etanol 70% e misturado no vortex por 10 segundos;
- ✓ Após, montamos a coluna para cada amostra, onde colocamos 600 µl de RNA + etanol 70% e centrifugamos por 1 minuto a 14000 rpm;

- ✓ Após, por 3 vezes descartamos o tubo e colocamos a coluna em um novo para lavagem da mesma com 400 µl de tampão de lavagem do kit, e centrifugamos a 14.000 rpm por 1 minuto;
- ✓ Para secagem da coluna, centrifugamos apenas a coluna com um novo tubo por 2 minutos;
- ✓ Após, acrescentamos 50 µl de tampão de eluição, centrifugamos a 2.000 rpm por 2 minutos e após a 14.000 rpm por 1 minuto.
- ✓ A coluna foi descartada e o conteúdo eluído foi armazenado a -20 °C.

4.4 Geração de cDNA

Para obter cDNA a partir das amostras de RNA, utilizamos o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com instruções do fabricante.

- ✓ A quantidade e a pureza das amostras foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). Em seguida, utilizando no máximo 2µg de RNA por amostra, acrescido com aproximadamente 8 µl de água, acrescentamos 2 µl de “10x RT Buffer”, 0,8 µl de “25x dNTP Mix”, 2 µl de “10x RT Random Primers”, 1 µl de “MultiScribe Reverse Transcriptase” e 4,2 µl de H₂O livre de Nuclease por amostra, totalizando 20 µl.
- ✓ Todas as amostras foram colocadas em termociclador seguindo:
 - 1º Passo: 25 °C por 10 minutos;
 - 2º Passo: 37 °C por 120 minutos;
 - 3º Passo: 85 °C por 5 minutos;
 - 4º Passo: 4 °C por ∞;
- ✓ Em seguida as amostras foram mantidas a -20°C até o PCR.

4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR)

O cDNA foi amplificado utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR) com iniciadores para os alelos:

- XM_809691, Esmeraldo-like (465bp):
 - Forward 5' GGATACAACCACAAGGAGCCC 3';
 - Reverso 3' CGCATTCCTCATTTCTTCCC 5';

- XM_812182, non-Esmeraldo-like (543bp):
 - Forward 5' TACGGTCCAGGGGAGCAGT 3';
 - Reverso 3'CTGCCTTCTCTCCTCCTCTCC 5'.

Também utilizamos gene RNA ribossomal 24Sa (D7) (primers D71 e D72) (SOUTO & ZINGALES, 1993).

Na PCR, utilizamos três soluções (Mix), sendo uma para o alelo menor (Esmeraldo-like), uma para alelo maior (non-Esmeraldo-like) e uma para o gene constitutivo D7, sendo que cada uma continha 300 µg de primers e SYBR® GREEN (Invitrogen), ao passo que, no final, cada poço tinha 5 µl de cada amostra diluída, totalizando 25µl. Os experimentos foram realizados em três vezes (três amostras diferentes) em triplicata (cada amostra ocupou três poços na placa).

A PCR realiza a quantificação dos nucleotídeos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Thresbold* (C_T), que permite fazer uma avaliação quantitativa e/ou semi-quantitativa. No nosso caso, os valores de C_T foram normalizados utilizando o D7, seguindo a equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Analisando os dados de PCR em tempo real pelo método comparativo C_T / Schmittgen).

Realizamos a curva de eficiência e utilizamos as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 20 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, anelamento a 60 °C durante 1 minuto, extensão a 72 ° C durante 1 minuto.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo student-test, sendo feita comparação entre cepas e após, entre formas, utilizando o programa GraphPad Prism 6®.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolados de *T. cruzi* mostram uma gama de variação importante, como fatores imunológicos, patológicos (morbidade e mortalidade), biológico e características clínicas (CINGALES, 1999; CARRANZA, 2009). Apesar de sabermos que todas as DTUs são capazes de causar a doença de Chagas em humanos, as diferenças mostram, por exemplo, que a DTU IV é raramente encontrada em humanos e que *T. cruzi* II e V aparentemente seriam mais “patogênicas”, promovendo as manifestações cardíaca e digestiva da Doença de Chagas (ZINGALES, 2011). É provável que a maior parte desta variação seja devido a diferenças genéticas entre isolados que podem ser relacionados com a DTU específica, sendo assim, a análise da expressão de alguns genes se faz de grande auxílio para entendermos melhor o comportamento de cada DTU.

Aqui, analisamos a expressão dos alelos do gene da P21 de *T. cruzi* em diferentes formas e cepas. Para este propósito, utilizamos iniciadores para amplificar o alelo maior, de 543pb (non-Esmeraldo-like) e alelo menor, de 465bp (Esmeraldo-like). No entanto, devido à alta semelhança na sequência de nucleotídeos entre os dois, não poderíamos indicar com plena certeza que o iniciador para o alelo menor amplificou apenas este, porém, o iniciador específico para o alelo maior, sim.

CL-Brener é provavelmente uma cepa híbrida derivada de hibridação entre TcII e TcIII, assim, era esperado que as cepas G (TcI) e Y (TcII) não expressassem o alelo maior (non-Esmeraldo-like), uma vez que, provavelmente, ele veio da cepa TcIII. Apesar desta tendência, os nossos resultados mostraram que as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota da cepa Y (TcII) expressam o alelo maior e esta expressão foi maior em forma tripomastigota. Além disso, os dois alelos foram altamente expressos em todas as formas da cepa G (Figuras 1, 2 e 3).

Neste contexto, temos a cruzipaína, que é uma enzima expressa por todas as DTUs e diretamente ligada à virulência do parasito. Assim, esperava-se que, como no comportamento com a cruzipaína, quanto mais considerada virulenta a DTU, maior a expressão da P21, sendo que, em nosso caso, as cepas G e RN-19 são consideradas as menos virulentas do estudo, percebeu-se que a cepa G, demonstrou que a expressão da P21 é contrária, já que estas cepas expressaram a P21 até mais que as outras duas (Figuras 1, 2 e 3).

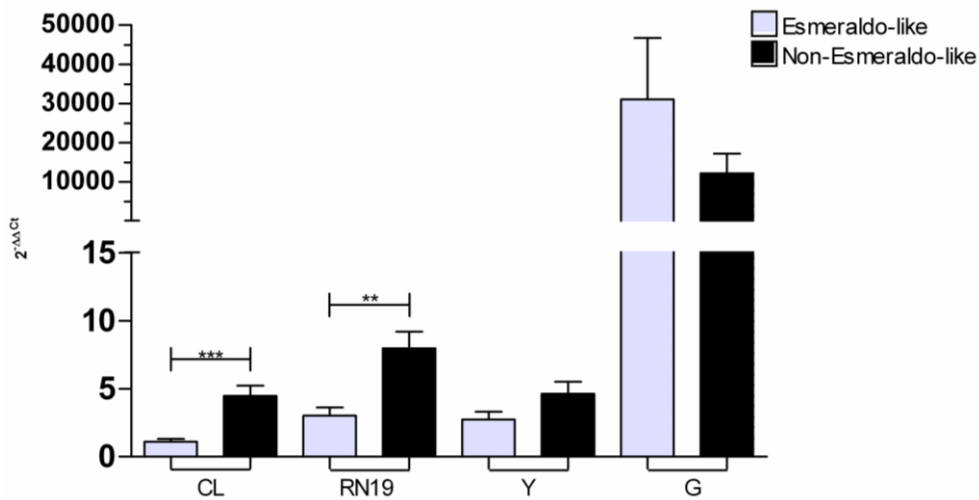


Figura 1: Expressão dos alelos de P21 em formas Amastigotas nas cepas CL, RN-19, Y e G de *T. cruzi*, demonstrando que a maior expressão de ambos alelos foi pela cepa G. Utilizado método student-test, sendo considerado estatisticamente significativo $P < 0,005$.

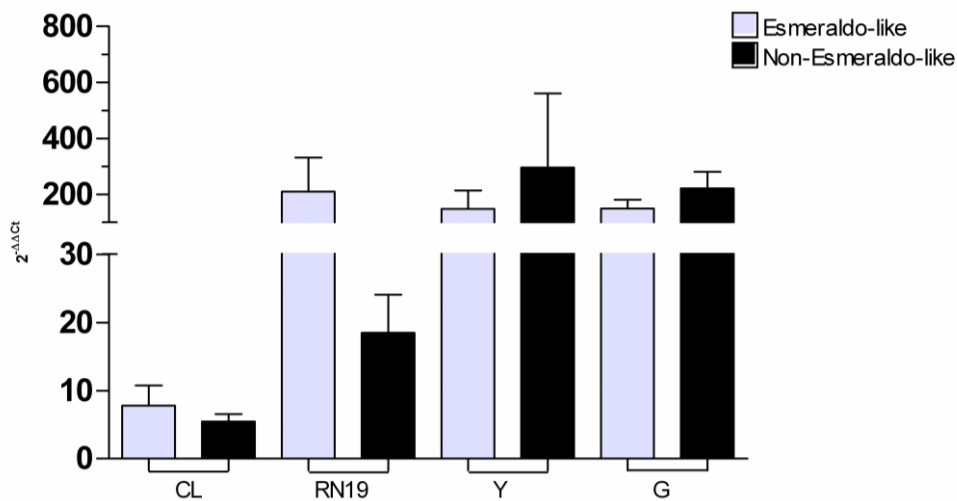


Figura 2: Expressão dos alelos de P21 em formas Tripomastigotas nas cepas CL, RN-19, Y e G de *T. cruzi*, demonstrando que a expressão dos alelos na forma Tripomastigota não depende da virulência da cepa. Utilizado método student-test, sendo considerado estatisticamente significativo $P < 0,005$.

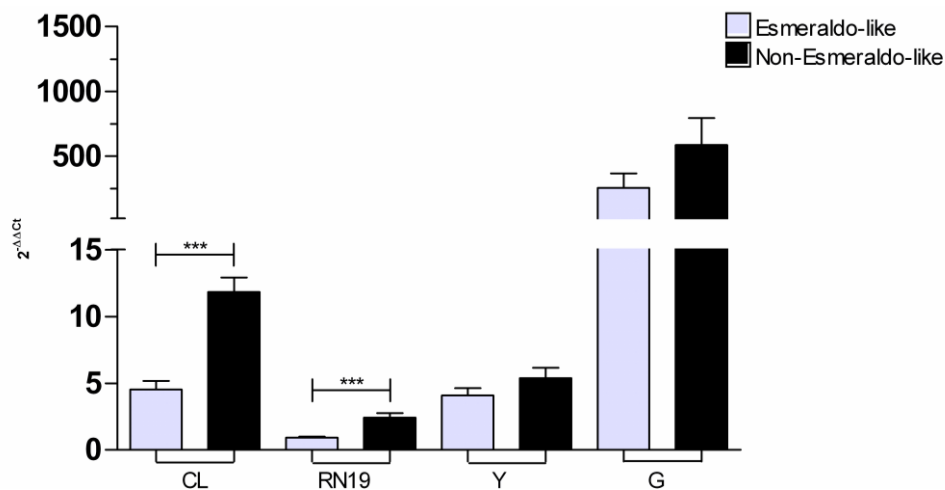


Figura 3: Expressão dos alelos de P21 em formas Epimastigotas nas cepas CL, RN-19, Y e G de *T. cruzi*, demonstrando que a maior expressão de ambos alelos foi pela cepa G. Utilizado método student-test, sendo considerado estatisticamente significante $P < 0,005$.

Autores afirmaram que uma fusão entre ancestrais das DTUs I e III deram origem a um híbrido heterozigótico que foi progenitor homozigótico das DTUs II e IV. A segunda hibridação entre DTU III e IV, gerou as cepas DTUs V e VI, o que resultou numa intensa heterozigosidade com subsequente recombinação de genótipos parentais (WESTENBERGER et al., 2005), o que poderia explicar a expressão dos alelos independente da DTU.

Voltando a nossa atenção para a expressão do gene P21, comparando diferentes formas infecciosas de diferentes DTUs, observou-se elevada expressão de ambos os alelos na forma tripomastigota de RN-19, Y e G (Figuras 4 e 5). Além disso epimastigotas da cepa G apresentaram elevado nível de expressão de ambos os alelos, sendo estatisticamente significante com a mesma forma das outras cepas. Uma observação surpreendente foi a alta expressão de ambos os alelos por amastigotas extracelulares da cepa G, que foi estatisticamente significante no alelo maior. Em relação à forma tripomastigota, observou-se que as cepas Y e G tiveram expressão estatisticamente significante em relação à cepa CL.

Este comportamento intrigante foi parcialmente explicado pela alta suscetibilidade destes parasitas para IFN- γ secretado no início da infecção (RODRIGUES et al., 2012b). Outra observação importante do nosso grupo foi a

demonstração de que a proteína P21-His₆ induz a invasão celular do parasita (SILVA et al., 2009) e a fagocitose, por ligação a receptores CXCR4 e induz a polimerização de actina da célula hospedeira de uma forma dependente da ativação da via de sinalização PI3-quinase. O CXCR4 é expresso por diferentes tipos de células, em vez de apenas em células hematopoiéticas e também que IFN- γ está relacionado com a polimerização do citoesqueleto de actina (RODRIGUES et al., 2012a). Resumindo, podemos propor que durante a infecção por amastigotas extracelulares da cepa G, é expressa muita P21 extra e intracelular juntamente com a ligação de IFN- γ . Ambos podem agir sinergicamente para polimerização de actina da célula hospedeira em torno dos parasitas internalizados, aprisionando-os dentro da célula hospedeira.

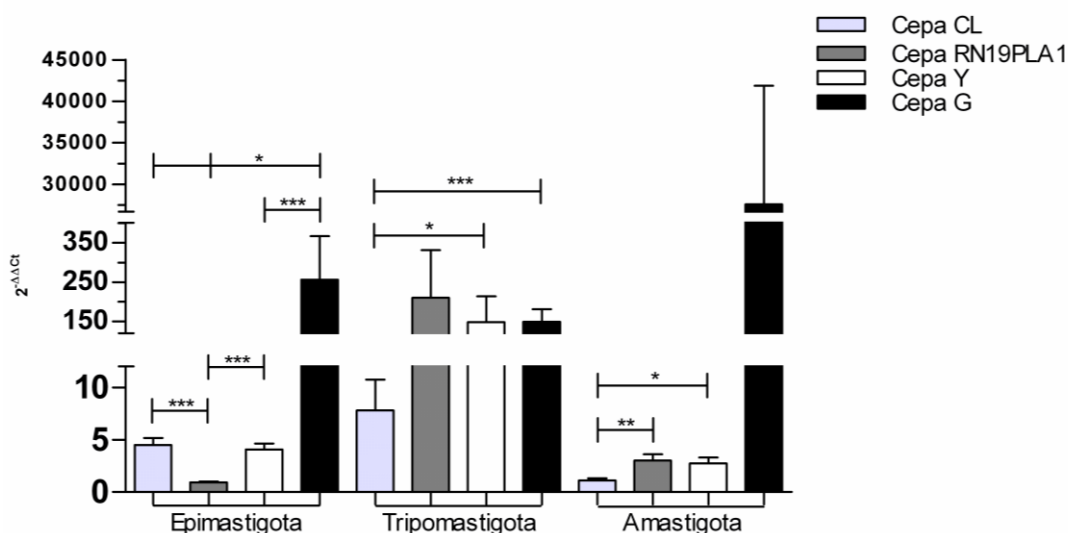


Figura 4: Expressão do alelo menor Esmeraldo-like da P21 nas três formas de *T. cruzi* das cepas CL, RN-19, Y e G demonstrando maior expressão na forma Amastigota da cepa G. Utilizado método student-test, sendo considerado estatisticamente significativo $P < 0,005$.

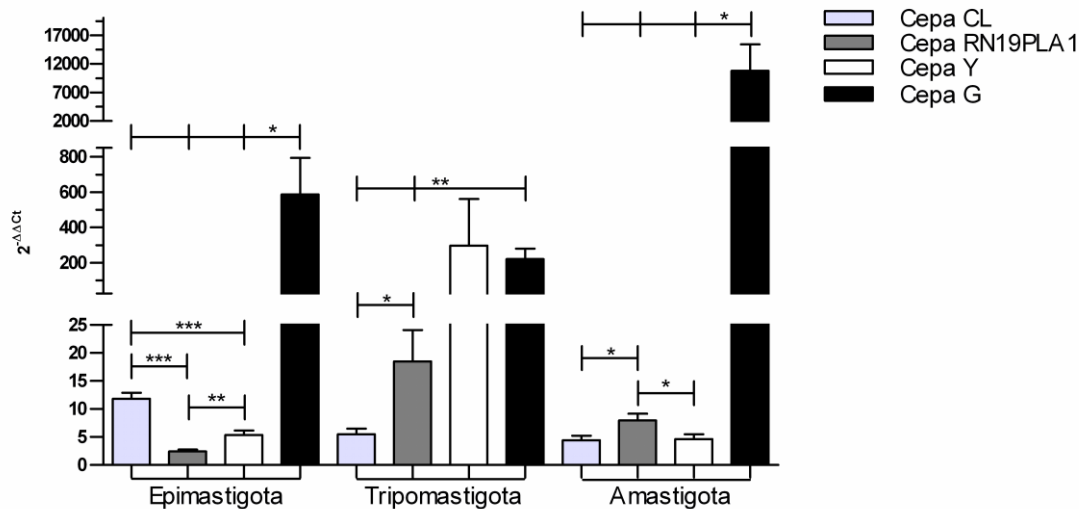


Figura 5: Expressão do alelo maior non-Esmeraldo-like da P21 nas três formas de *T. cruzi* das cepas CL, RN-19, Y e G demonstrando maior expressão na forma Amastigota da cepa G. Utilizado método student-test, sendo considerado estatisticamente significativo $P < 0,005$.

A razão para a importância deste resultado se baseia em nossos resultados atuais que levaram a nossa atenção para um possível papel de polimerização do citoesqueleto de actina como um passo importante para reter parasitas intracelulares ao longo da fase crônica da doença. Explica que tripomastigotas metacíclicos da cepa G mostram baixa infectividade *in vitro* e não há parasitemia *in vivo*. Inversamente amastigotas da cepa G são altamente infecciosos *in vitro*, mas não mantêm a infecção patente *in vivo* (dados não publicados). Assim, segundo nossos estudos, uma possível explicação para a falta de parasitemia *in vivo* por amastigotas extracelulares da cepa G seria sua rápida internalização na célula podendo estar diretamente associada a P21 (RODRIGUES, 2012B) assim, a expressão desta, ao contrario da expressão de cruzipaina, estaria ligada a rápida internalização e não a virulência.

6.0 CONCLUSÃO

- ❖ O estudo da expressão dos alelos da P21 foi extremamente importante para nosso maior entendimento sobre o comportamento de cada DTU, demonstrando pela primeira vez que a expressão dos seus alelos não se correlaciona com a maior virulência da DTU *in vitro*.
- ❖ Obtivemos mais uma peça para a explicação em particular do comportamento de amastigotas extracelulares da cepa G, assim, podemos supor que sua evolução está ligada à maior expressão de P21, assim como na cepa RN-19, estando relativamente em melhores condições de sobrevivência do que outras cepas mais virulentas.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIBERTI, J. C., MACHADO, F. S., SOUTO, J. T., CAMPANELLI, A. P., TEIXEIRA, M. M., GAZZINELLI, R. T., SILVA, J. S. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun**; 67(9):4819-26, 1999.

ALVES, M. J. M.; ABUIN, G.; KUWAJIMA, V. Y.; COLLI, W. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 21, p. 75–82, 1986.

ALVES, M. J.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104 (Suppl. 1), p.76-88, 2009.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 1135-1143, 2004.

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.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, p. 249-256, 1989.

ASAHI, H., KAWABATA, M., MORIBAYASHI, A., OKUMURA, H. Cytotoxic factors toward neuroblastoma cells in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Canadian Journal of Microbiology**; 32:711–8, 1986.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E. J. R.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**. v. 101, p.2034-2039, 2004.

BARRETO, M. P. - Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p. 89 – 151, 1979.

BELAUNZARAN, M. L.; WAINSELBAUM, M. J.; LAMMEL, E. M.; GIMENEZ, G.; ALOISE, M. M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J. Phospholipase A1 from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c. **Parasitology**;134:491–502; 2007.

BLACK, C. L.; OCANA, S.; RINER, D. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 12–16, 2007.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v.27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.5, p.220-224, 1963.

BRIONES, M. R. S.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 104, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal Parasitology**, v. 30, p. 35–44, 2000.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequenced-characterised amplified region markers. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 111, p. 95–105, 2001.

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. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology**. 1: 461 – 465; 1998.

BURLEIGH, B. A., WOOLSEY, A. M. Cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, 4(11), 701-711, 2002.

CALER, E. V.; VAENA DE AVALOS, S.; HAYNES, P. A.; ANDREWS, N. W.; BURLEIGH, B. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v. 17, p. 4975-4986, 1998.

CAMPOS, M. A.; ALMEIDA, I. C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E. P.; PROCOPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; SMITH, J. A.; GOLENBOCK, D. T.; GAZZINELLI, R. T. Activation of Toll-like receptor-2 by lysosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 416-423, 2001.

CARRANZA, J. C., VALADARES, H. M., D'AVILA, D. A., BAPTISTA, R. P., MORENO, M., GALVÃO, L.M., CHIARI, E., STURM, N. R., GONTIJO, E. D., MACEDO, A. M., ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in

Chagas disease patients from Brazil. **International Journal for Parasitology**, 39: 963-73, 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* n. gen, n. sp., agente etiologico de nova entidade mórbida do homem. **Memorial Instuto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159–218, 1909.

COULOMBE, P. A. & OMARY, M. B. “Hard” and “soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 14, 110-122; 2002.

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infection and Immunity**, v. 71 p. 6184-6191, 2003.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S. A. S.; MILES, M. A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 18, p.171–176, 2002.

CRUZ, M. C.; SOUZA-MELO, N.; SILVA, C. V.; ROCHA, W. D.; BAHIA, D.; ARAUJO, P. R.; TEIXEIRA, S. R.; MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: Role of d-Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. **Plos One**; e51804; 2012.

DE AYALA, A. P.; PÉREZ-MOLINA J. A.; NORMAN F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain. **Emerg Infect Dis**, v. 15. p. 607-608, 2009.

DE CARVALHO, T.U.; DE SOUZA, W. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 205-212, 1986.

DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v.86, p.197-283, 1984.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 88-126, 2000.

DELANOE, P.; DELANOE, M. A propos du *Schizotrypanum cruzi*. **Bulletion of the Exotic Pathology Society**, v. 5, p. 599–602, 1912.

DENNIS, E. A. Phospholipases. In: Boyer PD, editor. The enzymes. **New York: Academic Press**; p. 307–53, 1983.

DIAS, J. C. P. Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104 (Suppl. 1), p. 41-45, 2009.

DIAS, J. C. P. Control of Chagas disease in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, p. 336 - 341, 1987.

DINOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A De MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; RASCH, A. C. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 401–413, 2002.

ESPINOZA, B.; RICO, T.; SOSA, S.; OAXACA, E.; VIZCAINO-CASTILLO, A.; CABALLERO M. L.; MARTINEZ, I. Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-10, 2010.

EL-SAYED, N. M. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease. *Science* 309: 409–415, 2005.

FERNANDES, A. B.; NIEIRA, I.; FERREIRA, A.T.; MORTARA, R. A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitology Research**, v. 100, p. 59–68, 2006.

FERNANDES, A. B.; MORTARA, R.A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. **Microbes and Infection**, v.6, n.5, p.460-467, 2004.

FERNANDES, M.C.; CORTEZ, M.; GERALDO YONEYAMA, K.A.; STRAUS, A.H.; YOSHIDA, N.; MORTARA, R.A. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.13, p.1431-1441, 2007.

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

FUCHS, E. & CLEVELAND, Dd. W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science** 279, 514-519, 1998.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M. D.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F.; TEIXEIRA, A. R. L.; SCHREVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc 80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 47078–47086, 2001.

HALL, B. F. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of entry into host cells. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, p. 323-333, 1993.

HEMBROUGH, T. A., VASUDEVAN, J., ALLIETTA, M. M., GLASS II, W. F., GONIAS, S. L. A. Cytokeratin 8-like protein with plasminogen-binding activity is present on the external surfaces of hepatocytes, HepG2 cells and breast carcinoma cell lines. **J. Cell Sci**; 108, 1071-1082; 1995.

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, n.283842, p.1-10, 2010.

HUDSON, L.; SNARY, D.; MORGAN, S. J. *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. *Parasitology*, v. 88, p. 283-294, 1984.

IIDA, K.; WHITLOW, M. B.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. **Journal of Experimental Medicine**, v. 169, p. 881-891, 1989.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Molecular Biology and Evolution**; 27: 33–45, 2010.

LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.168, n.2, p.649-659, 1988.

MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.1, p.1-12, 2004.

MAYER, M.; ROCHA LIMA, H. Zum verhalten von *Schyzotrypanum cruzi* in warmblutern und Arthropoden. **Arch. Schiffs. Tropen-Hyg**, v.18, p. 101-36, 1914.

MEJIA-JARAMILLO, A. M.; PENA, V. H.; TRIANA-CHAVEZ, O. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. **Experimental Parasitology**, v. 121, p. 83–91, 2009.

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

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

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; FERNANDES, M. C.; SILVA, C. V.; FERNANDES, A. B.; L'ABBATE, C.; da SILVA, S. Host cell actin remodeling in response to *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote versus amastigote entry. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 47, p. 101-109, 2008.

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; FERNANDES, A. B.; SILVA, C. V.; FERNANDES, M. C. D. C.; L'ABBATE, C.; da SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n.1, p. 77-94, 2005.

NDE, P. N.; SIMMONS, K. J.; KLESHCHENKO, Y. Y.; PRATAP, S.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Silencing of the laminin γ -1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 1643–1648, 2006.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 557-561, 2003.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. **Current Opinion in Cell Biology**, v.16, n.4, p.422-428, 2004.

NUNES, L. R.; CARVALHO, M. R. C.; BUCK, G. A. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader and rRNA gene promoters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 86, p. 211-224, 1997.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico 17–20 de abril de 2005. Buenos Aires (AR).

OUAISSI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, G.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **Journal of Immunology**, v. 168, p. 6366-6374, 2002.

PAN, S. C. *Trypanosoma cruzi*: In vitro interactions between cultured amastigotes and human skin-muscle cells. **Experimental Parasitology**, v.45, n.2, p.274-286, 1978.

PINGE-FILHO, P.; PERON, J.P.S.; de MOURA, T.R.; MENOLLI, R.A.; GRACA, V.K.; ESTEVAO, D.; TADOKORO, C.E.; JANKEVICIUS, J.V.; RIZZO, L.V. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. **Immunology Letters**, v. 96, p. 283-290, 2005.

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I.A.; Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, v. 193, p. 90-98, 1999.

PROCÓPIO, D. O.; BARROS, H. C.; MORTARA, R. A. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Cell Biology**, v. 78, p. 911-924, 1999.

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.

QUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, p. 201-211, 1986.

RAMOS, J. M.; GONZÁLEZ-ALCAIDE, G.; GASCÓN, J.; GUTIÉRREZ, J. Mapping of Chagas disease research: analysis of publications in the period between 1940 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol.44, no.6, 2011.

RASSI, A.; RASSI Jr, A. Doença de Chagas. In: AMATO NETO, V.; GRYSCHER, R. C. B.; AMATO, V. S.; TUON, F. F. **Parasitologia: uma abordagem clínica**. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 127-138, 2008.

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 et Biologica**, v.26, p.17-45, 1956.

RODRIGUES, A. A., CLEMENTE, T. M., DOS SANTOS, M. A., MACHADO, F. C., GOMES, R. G. B. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **PLoS ONE**, 7(12), e51384, 2012a.

RODRIGUES, A. A.; SAOSA, J. S. S.; DA SILVA, G. K.; MARTINS, F.A.; DA SILVA, A. A.; SOUZA NETO, C. P. S.; HORTA, C. V.; ZAMBONI, D. S.; DA

SILVA, J.; FERRO, E. A.V.; DA SILVA, C. V. IFN- γ Plays a Unique Role in Protection against Low Virulent *Trypanosoma cruzi* Strain. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 6(4): e1598, 2012b.

ROCHETTE, A.; MCNICOLL, F.; GIRARD, J.; BRETON, M.; LEBLANC, E. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Molecular Biochemical Parasitology**; 140: 205–220; 2005.

ROMANHA, A. J. Heterogeneidade enzimática em *Trypanosoma cruzi*. 1982. 110 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

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

SANTOS, M. A. Estudos das vias de sinalização mobilizadas pela cepa G de *Trypanosoma cruzi* na invasão celular, da sinalização intracelular ativada pela proteína P21-His₆ e seu renovelamento. 2013. 98 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.**

SCHARFSTEIN, J., MORROT, A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas Disease. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.51-63, 1999.

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M. M. A.; LIMA, A.P.C.A.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B2 receptors. **Journal Experimental Medicine**, v. 192, p. 1289-1299, 2000.

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.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem Inst Os-waldo Cruz**; 102 (Suppl 1):75-85, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease, a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop**; 115:14-21, 2010.

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIONVANNA, B. ; CRUZ, M. C.; DA SILVA, E. A.; SOUTO-PADRON, 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.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.R.; CARDOSO, M.A.G.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4862-4867, 1995.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, n.2, p. 141-152, 1996.

STEINDEL, M.; DIAS, J. C. P.; ROMANHA, A. J. Doença de Chagas: mal que ainda preocupa. **Ciência Hoje**, v. 37, p. 32 – 38, 2005.

STURM, N. R.; VARGAS, N. S.; WESTENBERGER, S. J.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 269–279, 2010.

TAFURI, W. L. Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* infections. In: Lumdsen WHR, Evans DA, editors. *Biology of the kinetoplastida*. **London: Academic Press**; p. 547, 1979.

TAMURA, G. S. & NITTAYAJARN, A. Group B Streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. *Infect. Immun.* 68, 2129-2134, 2000.

TANOWITZ, H. B.; WEISS, L. M.; MONTGOMERY, S. P. Chagas disease has now gone global. **PLoS Negl Trop Dis**, 5:e1136, 2011.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 430–434, 2007.

TODOROV, A. G.; ANDRADE, D.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; BADER, M.; STEWART, J.; GERA, L.; MULLER-ESTERI, W.; MORANDI, V.; GOLDENBERG, R. C.; NETO, H. C.; SCHARFSTEIN, J. *Trypanosoma cruzi* induces edematogenic responses in mice and invades cardiomyocytes and endothelial cells in vitro by activating distinct kinin receptor (B1/B2) subtypes. **FASEB Journal**, v. 17, p. 73 – 75, 2003.

TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M.T.; VAN, M.E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 3626-3632, 1991.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in the control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitaemia and directly kills parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5177-5182, 1994.

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

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; PRATAP, S.; BURNS, J. R.; LIMA, M. F. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. **Molecular Cell Biology Research Communications**; 2:64–70; 1999.

WAINSZELBAUM, M.; ISOLA, E.; WILKOWSKY, S.; CANNATA J. J.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Lysosomal phospholipase A1 in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with a possible role in the pathogenesis of Chagas' disease. **Biochemical Journal**; 355:765–70, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of Chagas disease. **WHO Press**; Ginebra, 2002.

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

YOSHIDA, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.40, n.2, p.836-839, 1983.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**, v.57, n.2, p.105-109, 2008.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSENS, A.; FERNANDES, O. American Trypanosomiasis in Brazil based on dimorphism of rRNA and mini-exon sequences. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 105-112, 1998.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M.R.S. Epidemiology, Biochemistry and Evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94. p. 159- 164, 1999.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? **Revista da Biologia**; 6b: 44-48; 2011.

ZINGALES, S. G.; ANDRADE, M. R.; MACHADO, A. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI, **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 104, pp. 1051–1054, 2009.