

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi*
e caracterização biológica da proteína P21-His₆.**

FABRÍCIO CASTRO MACHADO

Uberlândia

Março – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi*
e caracterização biológica da proteína P21-His₆.**

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

Fabício Castro Machado

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva (Orientador)

Uberlândia

Março – 2014



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 (034)3218-2333
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



Fabício Castro Machado

“Galectina-3, AFAP1-L1 e WASP na invasão e multiplicação de *Trypanosoma cruzi* e caracterização biológica da proteína P21-His₆”

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, 25 de março de 2014.

Prof. Dr. Renato Arruda Mortara – UNIFESP

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila – INGEB/UFU

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva (orientador) – ICBIM/UFU

Meus Agradecimentos

*A Deus, aos meus pais e a minha família, aos meus amigos, ao LATRI e seus membros
— em especial à Karine, Aline, Thaise e Flávia, que mais colaboraram neste trabalho
— e ao Prof. Claudio pela confiança e pelas inúmeras possibilidades oferecidas.*

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1. Introdução	10
1.1. Parasita e Doença.....	10
1.2. Invasão e Tráfego Intracelular.....	11
1.3. Citoesqueleto de Actina e Proteínas Associadas.....	14
1.4. Proteína P21.....	15
2. Objetivos	17
2.1. Gerais.....	17
2.2. Específicos.....	17
3. Materiais e Métodos	18
3.1. Aspectos Éticos e Morais.....	18
3.2. Células e Animais.....	18
3.3. Transdução Celular e Obtenção de Células <i>Knockdown</i>	18
3.4. Expressão e Purificação da Proteína P21-His6.....	19
3.5. Citometria de Fluxo.....	20
3.6. Ensaio de Invasão e Multiplicação.....	20
3.7. Imunofluorescência.....	21
3.8. Quimiotaxia <i>In vivo</i>	22
3.9. <i>Biopanning</i> , Sequenciamento de DNA e Obtenção de Bacteriófagos.....	23
3.10. Implantes de Esponja.....	24
3.11. Determinação da Angiogênese pelo Conteúdo de Hemoglobina.....	25

3.12. Avaliação da Infiltração Celular pela Atividade da Mieloperoxidase (MPO)...	25
3.13. Avaliação da Infiltração Celular pela Atividade de N-Acetilglucosaminidase (NAG).....	26
3.14. Dosagem de Colágeno.....	26
3.15. Análises Histológicas.....	27
3.16. Análise Estatística.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Participação da Galectina-3 no Tráfego Intracelular de <i>T. cruzi</i>	28
4.2. Influência da Redução da Expressão das Proteínas AFAP-1L1, Galectina-3 e WASP na Invasão e Multiplicação por <i>T. cruzi</i>	30
4.3. AFAP-1L1, Galectina-3 e WASP Participam do Mecanismo Regulador do Citoesqueleto de Actina Durante o Tratamento com P21-His ₆ ?,.....	37
4.4. Obtenção de Bacteriófagos Ligantes à P21-His ₆ com Capacidade de Interferência nos Efeitos Biológicos da Proteína.....	38
4.5. Atividade Quimiotática da P21-His ₆	44
4.6. Efeitos Anti-Angiogênicos e Ativadores da P21-His ₆	46
5. Discussão.....	51
5.1. Galectina-3 Participa do Tráfego Intracelular do <i>T. cruzi</i> e Produz Estruturas do Tipo G3CS.....	51
5.2. AFAP1-L1 e WASP são Proteínas Associadas com a Invasão e Multiplicação do <i>T. cruzi</i>	51
5.3. Interação da P21-His ₆ com Bacteriófagos e sua Inibição específica.....	53
5.4. Atividades Biológicas da Proteína P21-His ₆ e seu Potencial Terapêutico.....	55
6. Conclusões.....	57
Referências Bibliográficas.....	58

RESUMO

O parasitismo de organismos celulares é alvo de constantes estudos e o processo pelo qual o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* invade a célula do hospedeiro ainda tem lacunas a serem preenchidas. As proteínas AFAP-1L1, galectina-3 e WASP são proteínas importantes para a célula do hospedeiro, participando de inúmeras atividades biológicas. Já a proteína P21, secretada pelo *T. cruzi*, foi recentemente caracterizada, se mostrando presente em todas as formas evolutivas do parasita. Nesse trabalho, estudamos a importância das proteínas AFAP-1L1, galectina-3 e WASP do hospedeiro durante a invasão e multiplicação do *T. cruzi* e também buscamos caracterizar funções biológicas da forma recombinante da P21, chamada P21-His₆. A participação da galectina-3 durante o tráfego intracelular de *T. cruzi* foi acompanhada por imunofluorescência, e a importância das outras proteínas do hospedeiro foram analisadas através de linhagens celulares *knockdown*, com reduzida expressão, para as proteínas de interesse. Os estudos das atividades biológicas da P21-His₆ se deram pela seleção de bacteriófagos ligantes específicos com a técnica de *Biopanning*, com o implante de esponjas interescapulares e a avaliação do processo inflamatório de corpo estranho e também pelo seu tratamento *in vivo* em animais Balb/c. Observamos que a proteína galectina-3 está presente em aproximadamente 20% dos eventos de invasão celular, formando estruturas contendo galectina-3 polarizada que vão desaparecendo ao longo do tempo, também observamos que a proteína AFAP-1L1 parece ter alguma importância no controle da multiplicação em tempos iniciais, assim como a redução da expressão proteína WASP parece facilitar a multiplicação do parasita, paralelamente ao fato de reduzir a invasão do mesmo. Observamos que a P21-His₆ tem capacidade de recrutamento celular, provavelmente pela sua interação com o receptor CXCR4, especialmente de macrófagos e neutrófilos ativados, e que também possui atividade anti-angiogênica. Obtivemos também bacteriófagos miméticos do CXCR4, capaz de se ligar especificamente à P21-His₆ e reduzir seus efeitos biológicos *in vitro*. Sendo assim concluímos a importância das proteínas do hospedeiro Galectina-3, AFAP-1L1 e WASP durante o estabelecimento da infecção por *T. cruzi* e concluímos que a P21-His₆ pode ter função terapêutica pela sua atividade anti-angiogênica, que possui alta capacidade quimiotática e que pode ser inibida por ligantes específicos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, citoesqueleto de actina, angiogênese, bacteriófagos, *knockdown*.

ABSTRACT

The parasitism of cellular organisms is a topic of high relevance to human health and is under constant investigation. The process by which the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* invades the host cells, thus causing the Chagas disease, is still not fully understood. In this work we study the role of AFAP-1L1, galectin-3 and WASP proteins on host cell invasion and characterize the biological functions of the P21 recombinant form, called P21-His₆. The AFAP-1L1, galectin-3 and WASP proteins participate in numerous biological activities on the host cell, while the P21 protein, a recently characterized protein present in the membrane of *T. cruzi*, is presented in all developmental stages of the parasite. We assessed the involvement of galectin-3 in the intracellular traffic of *T. cruzi* by immunofluorescence tracking, and the role of the other host proteins by *knockdown* cell lines. The biological activities of P21-His₆ were studied by selection of specific bacteriophages ligands with *Biopanning* technique, with implantation of sponges in Balb/c animals, treating or not with P21-His₆, and evaluating chemotaxis response when treating C57Bl/6 animals. We observed that galectin-3 is present in approximately 20% of cellular invasion events, forming structures containing polarized galectin-3 (G3CS) that fades over time. We also observed that AFAP-1L1 seems to have some importance in controlling early multiplications, and that reduction of WASP protein expression seems to facilitate parasite proliferation in parallel to the reduction of invasion. Thus, we conclude that these proteins are important for establishing *T. cruzi* infection. We observed that the P21-His₆ has anti-angiogenic activity and capacity for cellular recruitment – probably through interaction with the CXCR4 receptor – especially of activated macrophages and neutrophils. We also obtained mimetic CXCR4 bacteriophages capable of specifically binding to P21-His₆ and reducing its biological effects *in vitro*. Thus we conclude that P21-His₆ has high chemotactic capacity that can be inhibited by specific ligands, and may have therapeutic anti-angiogenic activity. Together these results may open the door to novel therapeutic interventions.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, actin cytoskeleton, angiogenesis, bacteriophage, *knockdown*.

1. Introdução

1.1. Parasita e Doença

Trypanosoma cruzi é um parasita flagelado que pertencente à Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e possui três apresentações morfológicas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento entre um estágio e outro é um processo complexo, envolvendo muitas mudanças estruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984).

O ciclo biológico de *T. cruzi* é heteroxênico, envolvendo um hospedeiro vertebrado (vários mamíferos, incluindo o homem) e um invertebrado (vetor) que é representado por insetos hemípteros da Família Reduviidae, cujos gêneros de maior importância são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (BARRETO, 1979).

O início do ciclo do parasita pode ocorrer quando o inseto triatomíneo ingere formas tripomastigotas juntamente com o sangue de um hospedeiro portador de *T. cruzi*. Estes parasitas passam então para o intestino médio do vetor, multiplicam-se como epimastigotas e no decorrer de algumas semanas migram para o intestino posterior, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Ao picarem um novo vertebrado, os insetos defecam, depositando suas fezes e urina com parasitas sobre a pele ou mucosas do hospedeiro. A penetração destes no organismo pode ser diretamente pelas mucosas ou quando o indivíduo coça o local da picada, provocando uma lesão tecidual. A partir daí, os tripomastigotas metacíclicos podem invadir uma variedade de tipos celulares, onde se diferenciam em amastigotas, que começam a se multiplicar após um período de 20 a 30 horas. No final da fase de multiplicação, quando a célula está abarrotada de parasitas, os amastigotas diferenciam-se novamente em tripomastigotas, que escapam das células hospedeiras para os espaços intercelulares (podendo até ganhar a circulação). Estes tripomastigotas, chamados tripomastigotas sanguíneos, podem então invadir novos macrófagos ou células de outros tecidos e órgãos do hospedeiro, ou serem ingeridos pelo inseto vetor durante seu repasto sanguíneo. A descrição do ciclo de *T. cruzi*, causador da doença de Chagas, foi realizada por Gaspar Vianna (VIANNA, 1911) ao analisar a necropsia de uma criança que havia morrido na fase aguda da infecção.

Além desse mecanismo vetorial, a transmissão da doença de Chagas pode ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, infecções laboratoriais acidentais, transplantes de órgãos e por via oral (DIAS, 1992). O primeiro surto de infecção humana por *T. cruzi* por via oral foi relatado em 1968, em uma escola agrícola

do município de Estrela (RS), onde 17 alunos apresentaram um quadro agudo da doença de Chagas e seis morreram. A fonte exata de contaminação não foi esclarecida, mas suspeita-se de alimento contaminado com o parasita. Já no período de 1968 a 2000, mais de 50% dos casos agudos de doença de Chagas registrados na Amazônia brasileira foram atribuídos a microepidemias de infecção transmitida oralmente (COURA *et al.*, 2002).

Estima-se que 25 milhões de pessoas estejam em zonas de risco para a doença de Chagas, enquanto que entre 8 e 10 milhões de pessoas já se encontram infectadas. (PEREIRA e NAVARRO, 2013). A doença de Chagas apresenta quadros clínicos variáveis sendo que na fase aguda, a qual aparece logo após a infecção, possui uma elevada parasitemia e é responsável pela morte, por insuficiência cardíaca ou meningoencefalite, de aproximadamente 10% dos casos, principalmente em crianças. Já a fase crônica, com reduzida parasitemia, atinge órgãos internos como o coração, o esôfago, o cólon e o sistema nervoso periférico. E após um período assintomático de vários anos, manifestações de comprometimento visceral (sintomas cardíacos que podem levar à morte súbita, megaesôfago, megacólon e lesões no sistema nervoso periférico, ocasionando deservação) podem surgir. O aparecimento da miocardite chagásica crônica, por exemplo, pode estar envolvida com a lesão direta do tecido pelo parasito, a destruição de células ganglionares parassimpáticas do coração, reações de hipersensibilidade, de autoimunidades ou imunológicas e lesões isquêmicas secundárias a alterações microvasculares (BILATE *et al.*, 2008; RASSI & RASSI Jr., 2008, RIBEIRO *et al.*, 2012).

1.2. Invasão e Tráfego Intracelular

A interação entre o parasito e as células do hospedeiro vertebrado exige a participação ativa de componentes de membrana de ambos envolvendo usualmente um ligante codificado pelo patógeno e um receptor na célula hospedeira (BEACHEY, 1981; SCHENKMAN *et al.*, 1991). A entrada de *T. cruzi* nas células hospedeiras é mediada pela interação entre ligantes localizados na superfície do parasita e seus respectivos receptores na célula alvo. Desse modo, removendo-se componentes da membrana de macrófagos por ação de tripsina, inibe-se significativamente a interação com tripomastigotas metacíclicos ou sanguíneos (NOGUEIRA e COHN, 1976; ALCÂNTARA e BRENER, 1980). Formas tripomastigotas tratadas com tripsina apresentam diminuição de 90% na sua capacidade infectante, retornando aos níveis

normais após 3 a 4 horas de incubação com meio sem tripsina (ANDREWS *et al.*, 1984; COLLI, 1984). A utilização de um inibidor de síntese protéica (cicloheximida) impediu a recuperação total da capacidade infectante, e tripomastigotas tratados somente com o inibidor diminuem em cerca de 80% a infectividade (ZINGALES *et al.*, 1985).

Durante o curso da infecção, as formas tripomastigotas sanguíneas precisam superar as barreiras impostas pela matriz extracelular antes de atingir a célula alvo. Utilizando glicoproteínas de superfície pertencentes à superfamília da transialidase-gp85 o parasita liga-se a fibronectina e laminina (QUAISSI *et al.*, 1986; GIORDANO *et al.*, 1994, 1999) abrindo caminho para a ação da POP Tc80 que hidrolisa colágeno (SANTANA *et al.*, 1997; GRELLIER *et al.*, 2001) e utiliza das trans-sialidades, glicoproteínas e a P21 para completar seu processo de invasão.

O processo de invasão celular é diferente para cada forma infectiva do parasito sendo importante salientar que para um patógeno ser bem sucedido em seu processo de invasão celular, ele necessita vencer inicialmente as barreiras impostas pelo hospedeiro mamífero, como o sistema complemento, anticorpos e ingestão fagocítica (JUNQUEIRA *et al.*, 2010).

A invasão por tripomastigotas metacíclicos, que são formas tradicionalmente infectivas provenientes do hospedeiro invertebrado, desencadeia a formação de protrusões ricas em actina ao redor do parasito (SCHENKMAN e MORTARA, 1992) que culminam com a exocitose de lisossomos junto ao sítio de entrada do parasito, fenômeno decorrente da elevação de cálcio intracelular ocasionado pelo mesmo (TARDIEUX *et al.*, 1992; TARDIEUX *et al.*, 1994). As formas tripomastigotas possuem grande motilidade que pode ser utilizada para causar invaginações nas células invadindo-as num processo que mimetiza o reparo da membrana (TAM *et al.*, 2010, e FERNANDES *et al.*, 2011). No entanto, se a fusão lisossomal não acontece o parasita não interage com o citoesqueleto de actina e pode sair da célula revertendo o processo de invasão (ANDRADE & ANDREWS, 2004; WOOLSEY, 2004).

Foi observado que amastigotas extracelulares são potentes indutores de fagocitose podendo facilitar a invasão do parasita (MORTARA *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2013). Também existem dados indicando que amastigotas extracelulares induzem a formação de agregados de filamentos de actina no local de adesão bem como de estruturas semelhantes a crateras ou taças com a subsequente internalização do parasito (MORTARA, 1991; PROCÓPIO *et al.*, 1999).

Inibidores da geração de ATP já se mostraram ser capazes de inibir a adesão e penetração, sem alterar o movimento do parasita. E o tratamento com citocalasina D, uma droga que rompe microfilamentos e impede a formação de extensões de membrana plasmática mediadas por actina, tem pouco ou nenhum efeito na invasão celular por tripomastigota de cultura de tecido (TCT) (SCHENKMAN *et al.*, 1991). Por outro lado, formas amastigotas extracelulares não aderem a células hospedeiras tratadas com citocalasina D e a invasão ocorre de maneira dependente de microfilamentos funcionais (MORTARA, 1991; PROCÓPIO *et al.*, 1998).

Um estudo realizado por Kleshchenko *et al.*, (2004) mostrou que a expressão de galectina-3 é requerida para a infecção por *T. cruzi* e que o parasita usa galectina-3 para aderir e invadir a célula hospedeira humana. A interação do parasita com galectina-3 ocorre de forma a facilitar a adesão do parasita a laminina, desta forma, os autores sugerem que a galectina-3 interage com as proteínas de superfície do *T. cruzi* de um lado, e com laminina de outro, através dos domínios de reconhecimento de carboidrato (MOODY *et al.*, 2000). A galectina-3 também tem capacidade de se ligar à ácidos micólicos, presente em micobacterias (BARBONI *et al.*, 2005) e conhece-se sua influência no controle da infecção por *Neisseria meningitidis* (QUATTRONI *et al.*, 2012) e da sua secreção em neutrófilos e do seu potencial pró-inflamatório de sinalização parácrina (LINDEN *et al.*, 2013). De acordo com estudos realizados no laboratório, a galectina-3 é recrutada durante a invasão e o tráfego intracelular de formas amastigotas de *T. cruzi* e constitui em um marcador de lise do vacúolo parasitóforo (MACHADO *et al.*, 2013).

Durante a interiorização do parasita, o vacúolo parasitóforo funciona como um centro organizador de microtúbulos. Acredita-se que tal atividade é crítica no desenvolvimento da infraestrutura para transporte de lisossomos ao local da adesão parasita-célula (TYLER *et al.*, 2005). Esses lisossomos acidificam o vacúolo parasitóforo e aproximadamente 8 horas após a infecção (LEY *et al.*, 1990), os parasitas rompem o vacúolo pela ação de uma hemolisina ativada pelo pH ácido (ANDREWS & WHITLOW *et al.*, 1989; ANDREWS *et al.*, 1990).

Foi observado que *T. cruzi* consegue inicialmente produzir uma remodelação do citoesqueleto de actina tornando-o mais rígido e facilitando a retenção do parasita, seguindo de um afrouxamento do citoesqueleto permitindo rápida multiplicação intracelular (MOTT *et al.*, 2009). O parasita diferencia no citoplasma e mantém sua

multiplicação até o momento em que se transforma em tripomastigota e lisa as células. (HALL *et al.*, 1993).

1.3. Citoesqueleto de Actina e Proteínas Associadas

Uma das atividades do citoesqueleto de actina se baseia em sua interação com sua proteína motora, miosina. Neste processo, a miosina atua durante a contração muscular e na nucleação da sua extremidade positiva causando polimerização dos monômeros de actina (ALBERTS *et al.*, 2002). A interação e regulação do citoesqueleto de actina se dão de muitas maneiras, sendo que várias proteínas participam desse processo. Entre elas, o complexo Arp2/3 (IRETON, 2013 e ZIGMOND SH, 1998), as *Rho small GTPases*: cdc42, Rac1, RhoA (MCCORMACK *et al.*, 2013), a *p21-activated kinases* (PAK) (ONG *et al.*, 2011), os fatores de promoção de nucleação WASP e WASP family *Verprolin-homologous protein* (WAVE) (DOMINGUES, 2009), e outras *actin-binding proteins* (ABP) como a profilina, Dia 1 (PAUL e POLLARD, 2009) e AFAP1-L1 (SNYDER *et al.*, 2011).

A WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) é uma proteína de ligação à actina. Sua ativação decorre da sua ligação com a proteína sinalizadora Cdc42 (*Cell Division Control protein 42 homolog*) (ROHATGI *et al.*, 1999) e tem sua ação pela ativação do complexo Arp 2/3 que participa da nucleação da actina (MACHESKY *et al.*, 1998).

AFAP-1L1 é uma proteína adaptadora análoga da AFAP-1, que participa na formação dos podossomos e interage também com cortactina durante a polimerização de actina no invadossoma de células musculares cardíacas de ratos (SNYDER *et al.*, 2011).

A função de proteína adaptadora é atribuída àquela proteína acessória que é capaz de realizar interações “proteína-proteína”, importantes na transdução de sinais intracelulares. Resumidamente, já se estabeleceu que a AFAP-1, além da interação com actina (QIAN *et al.*, 2000), possui os seguintes domínios de ligação: SH2 (GUAPPONE *et al.*, 1998) capaz de reconhecer a fosforilação de proteína quinase e de se localizar com as mesmas (PAWSON e SCOTT, 1997); SH3 (GUAPPONE e FLYNN, 1997) capaz de se ligar a sequências ricas em prolina (FENG *et al.*, 1994), PH (GIBSON *et al.*, 1994; SHAW, 1996) capaz de se ligar com grupos de fosfatidilinositol e então regular o direcionamento de proteínas para determinadas regiões da célula (LEMMON

et al., 1995) e leucine-Zip (lZip) (QIAN *et al.*, 2000) útil para a auto associação de AFAP-1 (QIAN *et al.*, 2004).

A galectina-3 é uma lectina com afinidade por beta galactosídeos e está presente em fagolisossomos, em vesículas, túbulos provenientes da via endocítica (PAZ *et al.*, 2010), em balsas lipídicas e projeções da membrana (HSU *et al.*, 2009). Dentro desse contexto, buscamos explorar a participação das proteínas intracelulares AFAP1-L1, Galectina-3 e WASP durante o processo de invasão e multiplicação de *T. cruzi* e sua participação na polimerização do citoesqueleto de actina.

1.4. Proteína P21

A proteína P21 foi caracterizada, sendo secretada por todas as formas evolutivas do parasita e desempenhando papel relevante durante a invasão de células não fagocíticas por tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares (SILVA *et al.*, 2009).

Anticorpos policlonais desenvolvidos contra a forma recombinante da proteína, P21-His₆, inibiram a invasão celular por formas amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos da cepa G. Outros testes também mostraram que a adição da proteína recombinante 30 minutos antes de colocar os parasitas para invadirem, inibiu a invasão por amastigotas extracelulares tanto da cepa G quanto da cepa CL. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a pré-incubação com a P21-His₆ poderia dessensibilizar a célula, ativando eventos de sinalização cruciais para a internalização do parasita antes de seu contato. Por outro lado, foi observado efeito contrário quando a P21-His₆ foi adicionada às células ao mesmo tempo em que os parasitas, ou seja, houve aumento da invasão celular tanto por amastigotas extracelulares quanto por tripomastigotas metacíclicos. Desta forma, especula-se que a P21-His₆ tenha uma atividade local, logo após a adesão do parasita à célula hospedeira. (SILVA *et al.*, 2009).

Outros dados (RODRIGUES *et al.*, 2012) mostraram que a P21-His₆ se liga ao receptor de quimiocinas CXCR4, pois o tratamento de células com a quimiocina SDF-1 alfa (que se liga ao CXCR4) reduziu a quantidade de partículas de zimosam fagocitadas por macrófagos peritoneais. Neste mesmo trabalho foi verificado que a P21-His₆, ao se ligar ao seu receptor, sinaliza via PI3-quinase, AKT, Erk 1/2 e Mek 1/2. Também já observamos que a P21-His₆ solúvel apresenta as mesmas funções biológicas que a P21-

His₆ renovelada, utilizada em nossos experimentos, (SANTOS *et al.*, 2014). A expressão da P21-His₆ é distinta entre diferentes cepas de *T. cruzi* (FERNANDES, 2013) e o seu tráfego pelas vias endocíticas apresenta-se com pouca colocalização com marcadores lisossomais em experimentos de cinética (MARTINS, 2013).

Sabendo da sua interação com o receptor CXCR4, e buscando entender mais os processos biológicos que a P21-His₆ participa, resolvemos utilizar um modelo descrito por Grindlay *et al.*, (1951). O modelo consiste na implantação de matrizes esponjosas no tecido subcutâneo de mamíferos. A matriz implantada induz uma reação inflamatória tipo corpo estranho, com a formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos. A utilização de implantes de esponjas permite o estudo do infiltrado inflamatório em vários tempos, de acordo com a época da remoção da matriz, permite ainda a análise bioquímica dos fluidos coletados, bem como o efeito de fármacos sobre o processo (BAILEY, 1988). Sendo assim, empregamos de diferentes modelos para estudarmos os efeitos biológicos *in vivo* da P21-His₆ e começar a caracterizar algumas de suas funções, além de procurar por ligantes específicos para a P21-His₆.

2. Objetivos

2.1. Gerais

- Analisar influências das proteínas AFAP1-L1, Galectina-3 e WASP da célula do hospedeiro na interação parasita-hospedeiro *in vitro*.
- Caracterizar atividades biológicas da P21-His₆.

2.2. Específicos

- Analisar a participação da galectina-3 durante o tráfego intracelular de *T. cruzi*.
- Estudar os efeitos da redução de expressão das proteínas AFAP1-L1, Galectina-3 e WASP na célula do hospedeiro durante a invasão e multiplicação do parasita.
- Compreender o perfil de resposta ao tratamento com P21-His₆ em modelos de expressão reduzida para AFAP1-L1, Galectina-3 e WASP.
- Explorar a capacidade de recrutamento celular da P21-His₆ e o perfil celular recrutado.
- Avaliar a capacidade de ativação celular, indução de angiogênese e reparo celular pela P21-His₆.
- Avaliar o bloqueio da atividade da P21-His₆ pelo uso de competidores biológicos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Aspectos Éticos e Morais

Este estudo faz parte do projeto intitulado: “Estudos de moléculas envolvidas na invasão e tráfego intracelular das formas infectivas de *Trypanosoma cruzi* in vitro e in vivo. Emprego da P21 na indução de proteção contra a doença de Chagas.”, aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU) (Protocolo número 059/08).

3.2. Células e Animais

Células Vero (Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ), macrófagos provenientes de medula óssea imortalizados (iMoB/6) (gentilmente doadas pelo Me. Alexandre Luiz Neves Silva do Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata, da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto), os mioblastos murinos (C2C12) (BCRJ) e *Human embryonic kidney* 293 (Hek) (BCRJ) foram utilizadas e mantidas em *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.

Tripomastigotas de cultura de tecido (TCT) da cepa G (YOSHIDA, 1983) foram mantidos em células Vero, em meio DMEM, 10% SFB. Amastigotas extracelulares (AE) foram obtidos a partir da incubação de tripomastigotas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) pH 5.8, suplementado com 5% SFB, por 16 a 18 horas a 37°C (MORTARA, 1991).

Foram também utilizados camundongos C57BL/6 ou Balb/c mantidos com alimento e água *ad libitum*. Macrófagos peritoneais foram obtidos injetando-se solução de tioglicolato a 3% e, após 72 horas, o animal é eutanasiado e uma lavagem peritoneal é realizada com PBS gelado.

3.3. Transdução Celular e Obtenção de Células *Knockdown*

A transdução das células iMoB/6 foi realizado seguindo as instruções do fabricante da partícula lentiviral (Santa Cruz). Resumidamente, as células foram plaqueadas a 3x10⁵/poço em placa de seis poços. No dia seguinte foram incubadas com

5µg/mL de Polybrene (Santa Cruz sc134220), para neutralizar a carga da membrana da célula e facilitar a ligação dela com capsídeo viral, e incubados com as respectivas partículas lentivirais para AFAP-1L1 (Santa Cruz sc92010V), Galectina-3 (Santa Cruz sc35443) e WASP (Santa Cruz sc36830) durante a noite. As células foram repicadas e quando nova confluência foi atingida iniciou-se o tratamento com 5µg/mL de Puomicina (Santa Cruz sc108071) no 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 puomicina retiradas gradativamente.

3.4. Expressão e Purificação da Proteína 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 do mesmo meio e incubada a 37°C, com agitação a 150 rpm, até atingir Abs.600=0,6-0,9 quando foi adicionado 1mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), para indução da produção protéica, e deixou-se incubando mais 3 horas. A cultura pós-indução foi centrifugada a 1600 x g por 10min a 4°C, e o precipitado foi ressuspenso em PBS gelado, na proporção dois ml de PBS para cada 100 ml da cultura. O material foi congelado durante a noite e, após descongelamento, foi incubada com 1mg/mL de lisozima por 20 minutos 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 ressuspenso em tampão com ureia 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 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M), a resina foi lavada três vezes com *Washing Buffer* (imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M) e, por fim, quatro eluições com *Elution Buffer* (imidazol 1M, NaCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, ureia 6M), contendo aumentadas concentrações de imidazol para competir com a cauda de histidina pela coluna de níquel e liberar a proteína recombinante purificada.

Todo o material eluído foi dialisado em PBS com uma membrana de diálise de 3,5kDa (Spectra/Por 131198) por 48 horas para a purificação da proteína dos resíduos

de ureia e outros. 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 a partir da observação de uma banda de altura ideal isolada.

3.5. Citometria de Fluxo

Para a confirmação do *knockdown*, iMoB/6 *wild-type* (WT) e *knockdown* para AFAP-1L1, Galectina-3 e WASP 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 horas. Uma solução de 1×10^6 /mL de células foi preparada e anticorpos feitos em coelho anti-AFAP-1L1 (Santa Cruz sc134653) e anti-WASP (Santa Cruz sc8353) e anticorpos feito em cabra anti-Gal-3 (Santa Cruz sc19283) foram incubados em uma diluição de 1:100 feita em PGN+0,1% Saponina durante a noite em 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 fluoróforo verde (FITC) anti-coelho (Invitrogen A11034) ou anti-cabra (Molecular Probes). Após três horas as células foram lavadas em PBS e ressuspensas em PBS e submetidas à análise no citômetro FACS Canto II. Os resultados da citometria foram analisados pelo software FlowJo 10 (<http://www.flowjo.com/>).

Para estudar o efeito da P21-His₆ na intensidade de polimerização do citoesqueleto de actina, células *knockdown* foram plaqueadas a 1×10^6 por poço em placa de seis poços (Nest) e mantidas até o dia seguinte quando foram incubadas com 40 µg/mL de P21-His₆ durante 1 hora. Após esse tempo as células foram raspadas com *cell scraper* (Costar 3010) 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 horas. As células foram incubadas em uma solução de faloidina-TRITC (Sigma P1951) a 1:500 feita em PGN+0,1% Saponina durante 2 horas, lavadas com PBS e submetidas à análise no citômetro FACS Canto 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/>).

3.6. Ensaios de Invasão e Multiplicação

Macrófagos peritoneais foram realizados plaqueando as células sob lamínulas de 13 mm em placas de 24 poços e submetidos à infecção com 5 formas tripomastigotas por célula. Os tempos analisados foram de 15 e 30 minutos, 3 e 6 horas. Após os tempos de estudo, as lamínulas circulares foram retiradas da placa de 24 poços (Nest) e transferidas para outra placa, onde foram incubadas com uma solução de formaldeído 4% feito em PBS por pelo menos 1 hora antes de serem lavadas com PBS e incubadas em PGN para bloqueio de sítios inespecíficos e preservação da amostra até o procedimento de imunofluorescência e análise.

Para os ensaios de invasão e multiplicação, as células *knockdown* obtidas foram plaqueadas sob lamínulas de 13 mm em placas de 24 poços e submetidas à infecção com tripomastigotas e amastigotas da cepa G de *Trypanosoma cruzi*. Para os ensaios de invasão, de duração de 2 horas, 8×10^4 células foram plaqueadas em um dia e incubadas em DMEM durante a noite para serem infectadas com cinco tripomastigotas ou amastigotas, na presença ou ausência de $40 \mu\text{g/mL}$ de P21-His₆, por célula no dia seguinte. Para os ensaios de multiplicação, com durações de 48 horas, 72 horas e 96 horas, 4×10^4 , 3×10^4 e 2×10^4 de células foram plaqueadas, respectivamente, e incubadas em DMEM durante a noite para serem infectadas com dois tripomastigotas ou amastigotas por célula no dia seguinte. Após os tempos de estudo, as lamínulas circulares foram retiradas da placa de 24 poços e transferidas para outra placa onde foram incubadas com uma solução de formaldeído 4% feito em PBS por pelo menos 1 hora antes de serem lavadas com PBS e incubadas PGN para bloqueio de sítios inespecíficos e preservação da amostra até o procedimento de imunofluorescência e contagem.

A contagem dos ensaios de invasão foi realizada contando-se um total cem células e avaliando em quantas destas havia algum parasita internalizado (% de invasão). Para os ensaios de multiplicação, a quantidade de amastigotas em 100 células infectadas foi contada.

3.7. Imunofluorescência

Para avaliar a localização da galectina-3 durante o tráfego intracelular de *T. cruzi*, macrófagos peritoneais submetidos a ensaios de invasão foram marcados para galectina-3 com um anticorpo monoclonal (gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira, Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto) na concentração de 5:1 em solução de PGN+0,1% saponina durante a noite, e no dia seguinte as lâminas

foram lavadas e incubadas com faloidina-TRITC (Sigma, P1951) na concentração de 1:500 para marcação do citoesqueleto de actina e um anticorpo anti mouse conjugado com FITC (Sigma, F0257) em solução de PGN+0,1% Saponina. As lâminas foram lavadas em PBS e montadas em glicerol tamponado com PBS pH 9,0 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD), para preservação da fluorescência das amostras.

Para a contagem dos eventos de invasão e da multiplicação intracelular, as lamínulas de 13 mm dos ensaios de invasão e multiplicação foram incubadas com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), para marcação de ácidos nucleicos e com soro chagásico humano (SCH) para a visualização do *T. cruzi*. A incubação foi feita inicialmente com SHC, diluído em 1:1000 em solução de PGN+0,1% Saponina, para permeabilização das membranas e internalização celular dos anticorpos, durante a noite, na geladeira, em câmara úmida e protegida da luz. No dia seguinte as lamínulas foram lavadas em PBS e incubadas com DAPI na concentração de 1:500 e um secundário anti-humano feito em cabra e conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que emite luz verde no comprimento de onda de 488nm, na concentração de 1:100 em solução de PGN+0,1% Saponina por pelo menos 2 horas. As lâminas foram lavadas em PBS e montadas em glicerol tamponado com PBS pH 9,0 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD) e 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.

3.8. Quimiotaxia *In vivo*

Camundongos C57BL/6 entre seis e dez semanas foram separados em dois grupos com diferentes tratamentos via intraperitoneal: 1) PBS; 2) 40ug/mL de P21-His₆. Três animais de cada grupo foram eutanasiados por deslocamento cervical nos tempos de cinética de 6 horas, 24 horas e 72 horas. Lavagens peritoneais foram realizadas com quatro mL de PBS sendo coletados necessariamente dois mL do lavado.

O recrutamento total de leucócitos foi quantificado por contagem em Câmara de Neubauer do material obtido em cada um dos animais.

Cinquenta microlitros de cada amostra recuperada foram colocados em uma lâmina de microscopia, secada e fixada em metanol puro (Synth A1085.01.BJ) por 5 minutos e depois submetidas à coloração de Giemsa (Sigma 32884) feita na concentração de 1:20, diluído em água, por 15 minutos. As lâminas foram lavadas com

água corrente e guardadas para posterior análise por microscopia óptica onde 100 células foram contadas diferenciando em linfócitos, monócitos e polimorfonucleares.

O conteúdo da lavagem das cavidades peritoneais de todos os camundongos foi centrifugado à 2500rpm por 5 minutos, teve o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de formaldeído 4%. A amostra fixou em formaldeído por pelo menos duas horas até que foi centrifugada a 2500rpm por 5 minutos e ressuspenso em PBS para em seguida ser submetida à citometria de fluxo (BD FACS Canto II), para avaliação do tamanho e da granulosidade das células e consequentemente separar as populações de monócitos, polimorfonucleares e linfócitos dentro dos leucócitos.

3.9. *Biopanning*, Sequenciamento de DNA e Obtenção de Bacteriófagos.

A técnica de *BioPanning* foi utilizada para a seleção de peptídeos sintéticos (expressos na proteína III do capsídeo de bacteriófagos) reativos com a P21-His₆. A biblioteca randômica de peptídeos foi a de 12 aminoácidos (Ph.D.-12) (New England Biolabs) contendo por volta de 10⁹ sequências peptídicas distintas.

Em um poço de microplaca, foram adicionado 10µL da P21-His₆ (1µg/µL) mais 90µL de tampão bicarbonato 0,1M (pH 8,6) e deixados durante a noite. No dia seguinte foram realizadas seis lavagens com 200µL de PBS+Tween 0,1% (PBS-T), seguindo-se da adição de um Tampão de Bloqueio contendo PBS-T+1% de BSA (Soro albumina bovina). Após o bloqueio, novas lavagens foram realizadas e se adicionaram ao poço, 10µL da biblioteca Ph.D.-12 em 90µL de PBS-T. A reação com a biblioteca de peptídeos durou uma hora, após o qual os peptídeos ligantes foram eluídos com uma solução de Glicina-HCl (pH 2,2). A partir do eluído foi feita uma amplificação dos fagos específicos utilizando a cepa bacteriana ER2738 para seu crescimento. Uma titulação realizada em placas do meio de cultura LB contendo IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) e X-Gal (Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside) foi realizada com os fagos eluídos e com os amplificados como forma de controle da quantidade de fagos liberadas e do volume do eluído necessário para o próximo passo. Todo este processo foi realizado três vezes (como forma de selecionar os fagos mais específicos), trocando-se apenas a exposição à biblioteca de peptídeos pela exposição ao eluído da vez anterior.

Ao fim do processo de seleção dos fagos, foi realizada a extração do DNA de fago por Iodeto de Sódio em uma solução contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM e NaI 4M. O DNA do fago permanece solúvel em altas concentrações de Iodeto de

sódio sendo precipitado apenas pela adição de etanol absoluto na sequência. A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram avaliadas por gel de agarose 0,8%.

O sequenciamento foi realizado com o sequenciador automático MegaBace 1000 (Amershan Biosciences) no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Para tal foi utilizado o primer M13 (Invitrogen), responsável por amplificar a região do DNA do fago correspondente aos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos, e o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Inc.), ambos de acordo com as instruções dos fabricantes. As sequências obtidas foram analisadas por programas de bioinformática *Protein Data Bank*, disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/> e *Pepsurf*, disponível em: <http://pepitope.tau.ac.il/> disponíveis gratuitamente online.

Para ensaios de competição com P21-His₆ ou natural do parasita, mioblastos murinos (C2C12) foram plaqueados em placas de 24 poços e incubados com 5 formas tripomastigotas da cepa G de *Trypanosoma cruzi* previamente incubadas (2 horas em temperatura ambiente e sob agitação) com diferentes concentrações de bacteriófagos selecionados especificamente para a proteína P21-His₆. As mesmas células também foram incubadas com a mesma quantidade de parasita e 40µg/mL de P21-His₆ previamente incubada com bacteriófagos específicos. Após a invasão por duas horas, as células foram lavadas com PBS, fixadas com Bouin e coradas com Giemsa.

3.10. Implantes de Esponja

O disco de esponja de poliéster com 1.2 cm de diâmetro (Vitafoam Ltda) foi conservado em álcool 70% v/v durante pelo menos 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervido em água destilada por 30 minutos (ANDRADE *et al.*, 1987).

Para a implantação das matrizes esponjosas, foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos, separados em grupos de 10 animais para análises bioquímicas e em grupos de cinco animais para análises histológicas, tratados ou não P21-His₆. Os animais foram previamente anestesiados intraperitonealmente, com Xilasina-Cetamina (Syntec) (60mg-4mg/kg) e submetidos à tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Os animais foram dispostos em mesa cirúrgica e foi realizada uma incisão mediana dorsal de aproximadamente 10 mm. Posteriormente, foi realizada a divisão do subcutâneo em direção craniana. O disco de esponja foi introduzido na região interescapular pela incisão mediana. A sutura das incisões foi feita com fio de

nylon 3.0 usando ponto Donati. Após recuperação da anestesia os animais ficaram dispostos em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum* (ANDRADE *et al.*, 1987). As soluções, preparadas em volumes de 20µL, foram injetados dentro da esponja a cada 72 horas e analisaram-se as fases aguda (1 dia) e crônica (9 dias) da inflamação.

Para remoção dos implantes os animais foram submetidos à eutanásia por inalação injeção com tiopental (Thiopentax) (30mg/kg). Após incisão mediana na região dorsal, os implantes foram dissecados, removidos, pesados e processados para estudos bioquímicos e histológicos.

3.11. Determinação da Angiogênese pelo Conteúdo de Hemoglobina

A dosagem do conteúdo de hemoglobina intra-implante foi feita utilizando-se o método do reagente de Drabkin desenvolvido em 1932 e adaptado como índice de vascularização por Plunkett e Hailey (1990) e Hu *et al.* (1995).

Os implantes foram retirados e suas massas determinadas no nono dia pós-implantação. As amostras que apresentaram hemorragia ou infecção à análise macroscópica foram excluídas do ensaio. Em seguida, cada implante foi homogeneizado (Tekmar TR-10, Ohio, USA) em 2 mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest) e adicionado em eppendorff de 2 mL. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos a 12.000 rpm e os homogenatos filtrados em filtros de 0,22 µm 40 (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540 nm (Leitor de Elisa), utilizando-se uma placa de 96 poços. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Análise diagnóstica) e os resultados foram expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido de implante.

3.12. Avaliação da Infiltração Celular pela Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Após a determinação do conteúdo de hemoglobina, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em 2 mL de tampão fosfato de sódio, pH 5,4. As amostras foram homogeneizadas em Vórtex por 30 segundos, foram transferidos 300 µL desse homogenato *eppendorfs* de 1,5 mL e foram acrescentados 600 µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato pH 5,4. Após nova homogeneização no vórtex, as amostras foram congeladas para posterior dosagem. Após o congelamento, as amostras foram descongeladas e

centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi posteriormente utilizado no ensaio enzimático.

O ensaio enzimático foi realizado em *ependorfs* de 1,5 mL, e a reação seguiu a seguinte ordem: 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003%, adicionar 100 µL de TMB (3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck); adicionar 200 µL do sobrenadante da amostra, deixar reagir por 1 minuto cronometrado, parar a reação com a adição de 100 µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico – Merck) a 4M. Em seguida, foram adicionados 200 µL à placa de 96 poços e a leitura espectrofotométrica foi feita em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em índice de MPO (Absorbância em D.O./mg de peso úmido do implante).

3.13. Avaliação da Infiltração Celular pela Atividade de N-Acetilglucosaminidase (NAG)

Após a utilização da esponja para dosagem de hemoglobina, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 2,0mL de solução salina 0,9% com Triton X-100 (Promega) a 0,1% (gelado). As amostras foram homogeneizadas em vórtex até obter uma suspensão homogênea e, posteriormente, centrifugada em 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio.

Para a realização do ensaio, foram adicionados 100µL das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Às amostras, foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida – Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5. Incubou-se a 37°C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100µL de tampão glicina 0,2M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400nm. A atividade de NAG no implante foi calculada a partir de uma curva padrão de p-nitrofenol avaliada paralelamente. O p-nitrofenol é o produto cromógeno da reação entre p-nitrofenol-N-acetil-β-D-glicosamina com a N-acetilglucosaminidase (NAG). Os resultados das leituras foram expressos em nmol mL⁻¹/mg de peso úmido do implante.

3.14. Dosagem de Colágeno

O implante foi homogeneizado com PBS-Triton X-100 a 0,1% e centrifugado a 6000g durante 10 minutos. Parte do sobrenadante foi transferida para novo tubo *ependorf* e uma curva padrão montada a partir de uma solução de gelatina 10mg/mL foi preparada. Adicionou-se o reagente picrossirius (Direct Red 80) a 0,1% em solução

saturada de ácido pícrico. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, centrifugadas a 10000g por 10 minutos e se descartou o sobrenadante. O sedimento foi lavado com etanol puro e homogeneizado no vórtex com 1 ml de NaOH 0,5M até total solubilização. O material foi transferido para placa de ELISA e teve o comprimento de onda lido a 540nm.

3.15. Análises Histológicas

Esponjas retiradas exclusivamente para processamento histológico foram fixadas em Tampão Metacarn (60% metanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) por 3 horas em geladeira. Após esse período as esponjas foram preparadas para inclusão em Álcool Etílico P.A. por 30 minutos, por quatro lavagens, e depois em Xilol por 30 minutos, e três lavagens. As esponjas seguiram para emblocamento em Parafina I, II e III, durante 90 minutos em cada e incluídas em Parafina. Os blocos foram processados e coloração Hematoxilina e Eosina (HE) foram realizadas. As imagens foram obtidas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, no microscópio Leica DM500 acoplado a câmera e software Las Ez.

3.16. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. A significância dos experimentos foi determinada pelo método ANOVA, com pós-teste Bonferroni, pelo GraphPad Prism (©GraphPad Software Inc, 1992-2007) versão 5.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ ou menor.

4. Resultados

4.1. Participação da Galectina-3 no Tráfego Intracelular de *T. cruzi*

Para avaliar se a proteína do hospedeiro galectina-3 participa do processo de invasão celular por *T. cruzi*, realizamos ensaios de cinética onde macrófagos peritoneais foram incubados com cinco parasitas da cepa G por célula e tempos de 15 minutos, 30 min, 3 horas e 6 horas foram observados por imunofluorescência. Na Figura 1A podemos observar o recrutamento de Galectina-3 (em verde) em colocalização (amarelo) ou não com o citoesqueleto de actina (em vermelho). No tempo de 15 min podemos ver a formação de estruturas em formato de cálice ao redor do parasita (seta branca), sugerindo o recrutamento tanto de galectina-3 quanto de actina no sítio de entrada do parasita. Aos 30 minutos observamos a mesma colocalização e nos tempos de 3 e 6 horas podemos ver apenas o recrutamento de galectina-3 de forma de estrutura localizada, polarizada, chamada de G3CS (*Galectin-3 Containing Structures*). Em B mostramos que a porcentagem de recrutamento de galectina-3 para os eventos de invasão do *T. cruzi* se deu em aproximadamente 20% dos eventos de parasitas internalizados ou internalizando e se manteve durante os tempos iniciais (0.25, 0.5 e 2 horas). Em C quantificamos os eventos G3CS em cinética até 48 horas pós-invasão. Podemos ver que a quantidade de estruturas vai reduzindo ao longo do tempo, sugerindo que esse fenômeno tenha importância nos momentos iniciais da invasão e logo após a lise do vacúolo parasitóforo pelo parasita antes do início de sua multiplicação livre no citoplasma.

Figura. 1

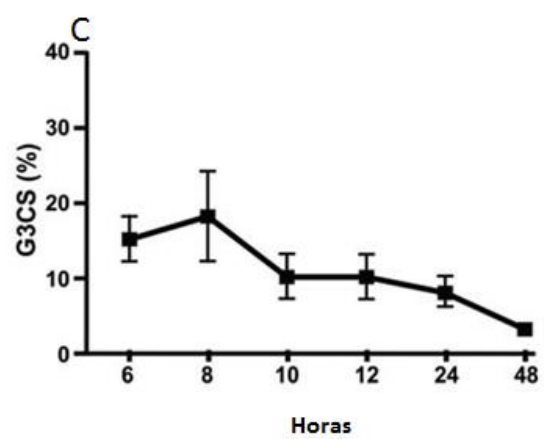
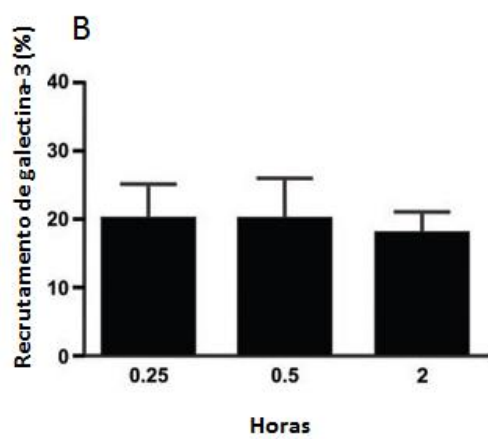
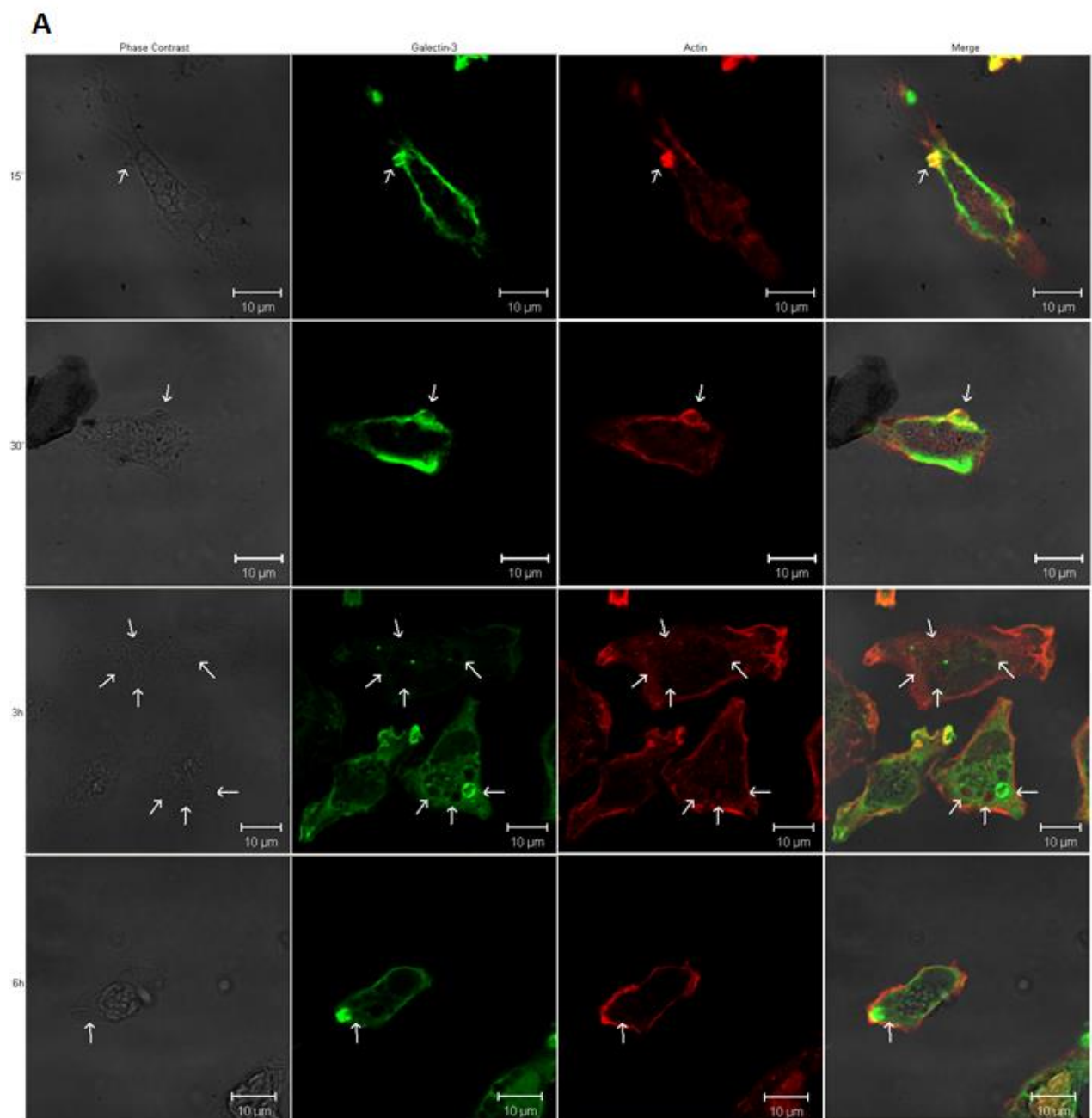


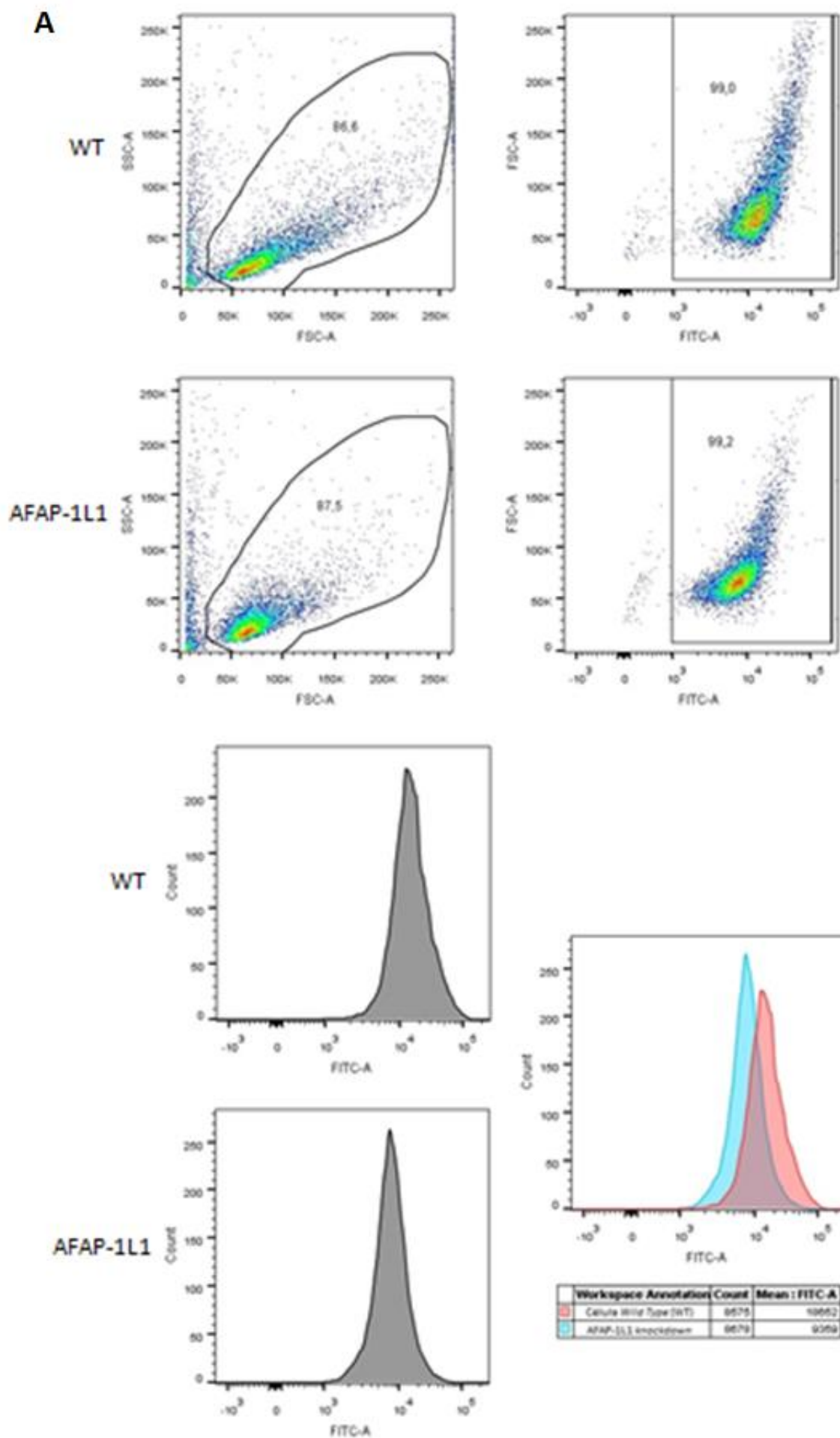
Figura 1: Recrutamento de galectina-3 durante cinética de invasão celular por *T. cruzi* da cepa G. (A) Galectina-3 (verde) e actina (vermelho) foram recrutadas e colocalizaram (amarelo, nas figuras da coluna *Merge*) durante a invasão pela cepa G de *T. cruzi* (contraste de fase e indicados pelas setas brancas). Nos tempos de 15 e 30 minutos podemos observar a formação de estruturas do tipo cálice e *ruffles* de membrana com colocalização das proteínas Gal-3 e actina. No tempo de 3 horas podemos observar parasitas em diferentes momentos da lise do vacúolo (indicado pela quantidade de galectina-3 ao seu redor) e produzindo estruturas contendo galectina-3 (G3CS) polarizada, assim como no tempo de 6 horas onde podemos ver formação de G3CS na metade do vacúolo do parasita. (B) Porcentagem de recrutamento de galectina-3 para os sítios de invasão de 100 parasitas nos tempos de 15 e 30 minutos e 2 horas. Observamos que o recrutamento de galectina-3 se manteve em aproximadamente 20% dos eventos durante os momentos de cinética estudados reforçando sua participação durante o tráfego intracelular de *T. cruzi*. (C) Cinética da porcentagem dos eventos de galectina-3 polarizada (G3CS) em 100 parasitas internalizados. Observamos que as estruturas contendo galectina-3 polarizadas começam a aparecer no início da invasão e vão reduzindo ao longo do tempo. Experimentos realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

4.2. Influência da Redução da Expressão das Proteínas AFAP-1L1, Galectina-3 e WASP na Invasão e Multiplicação por *T. cruzi*.

Macrófagos provenientes de medula óssea de C57BL/6 e imortalizados (iMoB/6) foram infectados com partículas lentivirais capazes de inserir seu DNA no código genético da célula do hospedeiro e produzir um segmento de shRNA capaz de interferir com a expressão de AFAP-1L1, Galectina-3 ou WASP, reduzindo-a. As linhagens deficientes (*knockdown*, KD) foram produzidas, selecionadas e submetidas à citometria de fluxo (Figura 2) para confirmar a redução da expressão. Na Figura 2A podemos ver como a metodologia foi aplicada e em B podemos ver a redução da intensidade média de fluorescência para as proteínas em células *knockdown* marcadas, mostrando uma redução de sua expressão.

Figura 2.

A



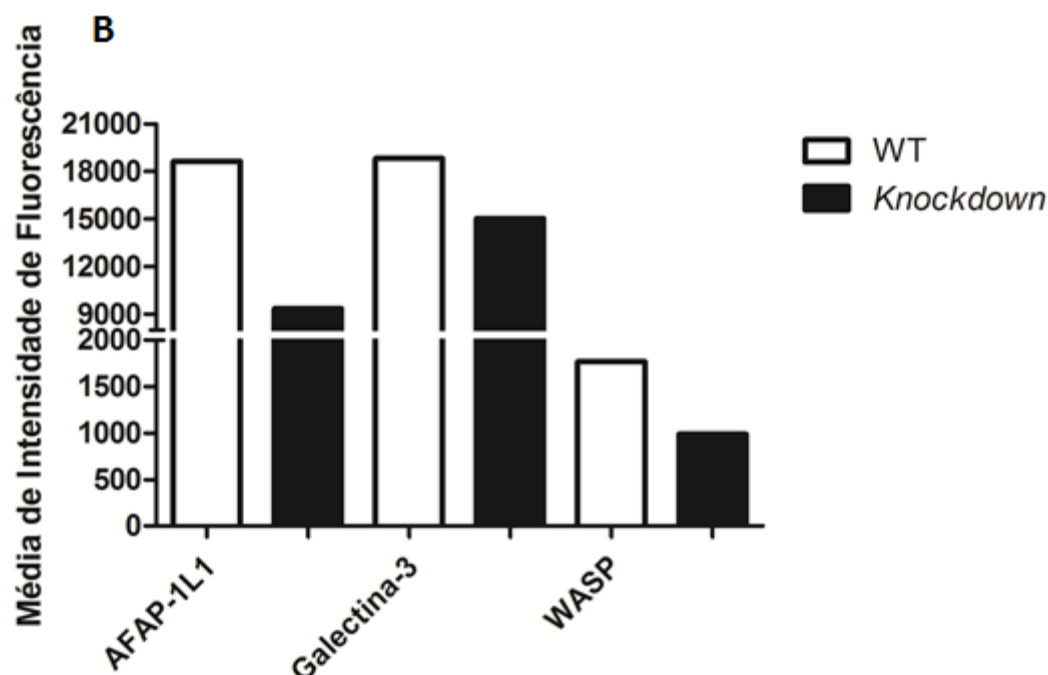


Figura 2: Citometria de fluxo para proteínas AFAP-1L1, Galectina-3, WASP e Actina. (A) Análise feita por citometria de fluxo onde células WT e AFAP-1L1 KD foram selecionadas e tiveram sua fluorescência média em FITC medida. Observamos um desvio para a esquerda de AFAP-1L1 *knockdown* (azul) no histograma de fluorescência mostrando uma menor intensidade que o controle WT (rosa). **(B)** Citometria de fluxo para as células *knockdown* demonstrou menor intensidade de fluorescência quando comparada com as células controles. A redução foi observada em todas as células *knockdown* marcadas para os seus respectivos anticorpos e comparadas com células WT. Resultados representativos de dois experimentos realizados independentemente.

Em seguida, as linhagens celulares obtidas foram submetidas a ensaios de invasão (2 horas) e multiplicação (48, 72 e 96 horas) para avaliar se a redução da expressão dessas proteínas na célula seria capaz de afetar a invasão ou a multiplicação do parasita, tanto em formas amastigotas (A e B) quanto em formas tripomastigotas (C e D) da cepa G de *T. cruzi*. Na Figura 3 podemos observar que não houve diferença na porcentagem de células infectadas (A) entre os controles selvagens (WT), controle de transdução (CTRL KD, produtora de um shRNA não interferente) e as proteínas testadas. Em B vemos a relação entre parasitas por célula infectada e também não observamos diferença entre as linhagens estudadas, sugerindo que o mesmo número de

células continuou sendo infectadas pelo mesmo número de parasitas. Já em C observamos que apenas as células *knockdown* para WASP tiveram uma reduzida invasão celular (** $p < 0,01$), sugerindo uma importância da atividade dessa proteína durante os eventos de invasão pelas formas tripomastigotas. Em D vemos uma relação entre a quantidade de parasitas nas células infectadas e não observamos variação nenhuma, sugerindo que mesmo havendo uma diferença na invasão a quantidade de parasitas nas células infectadas não se alterou.

Figura 3.

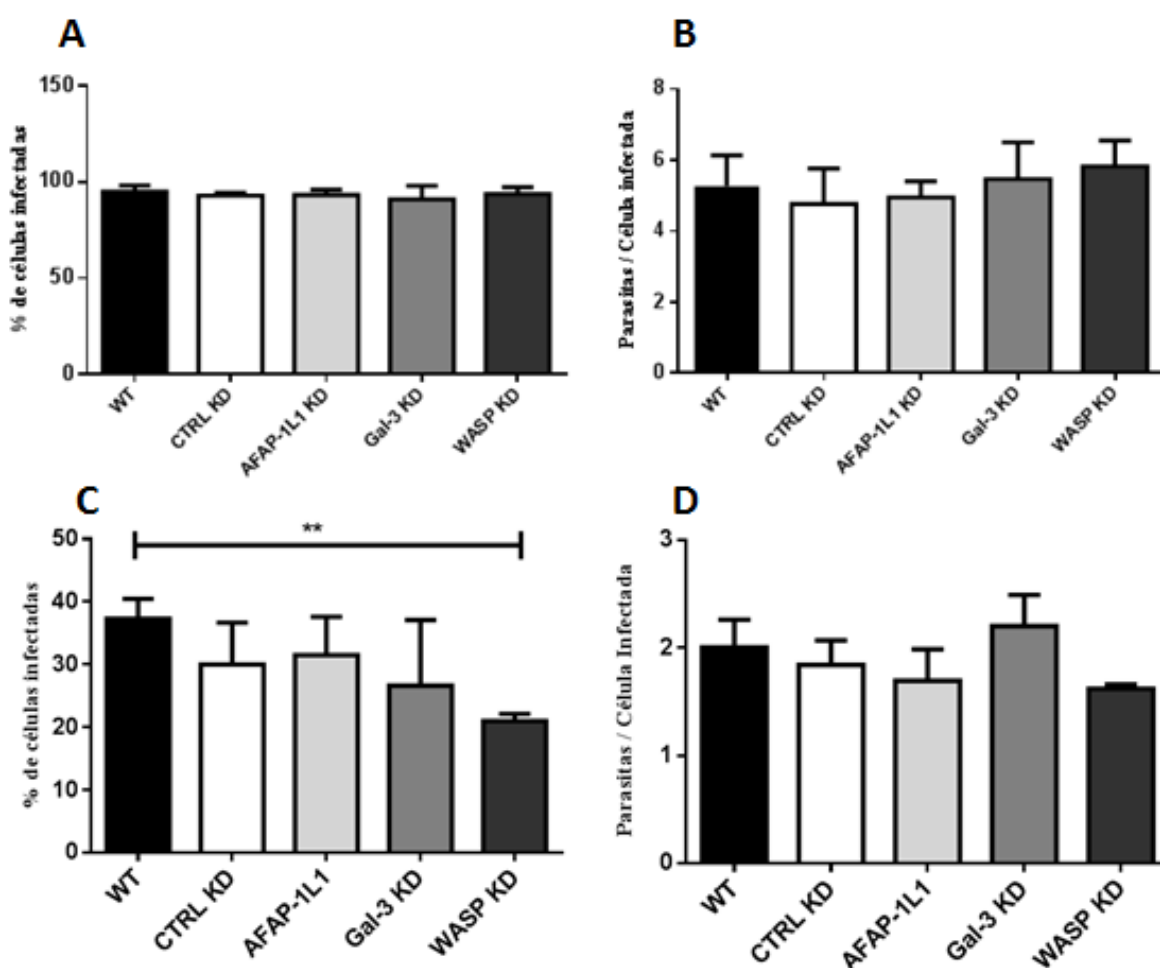
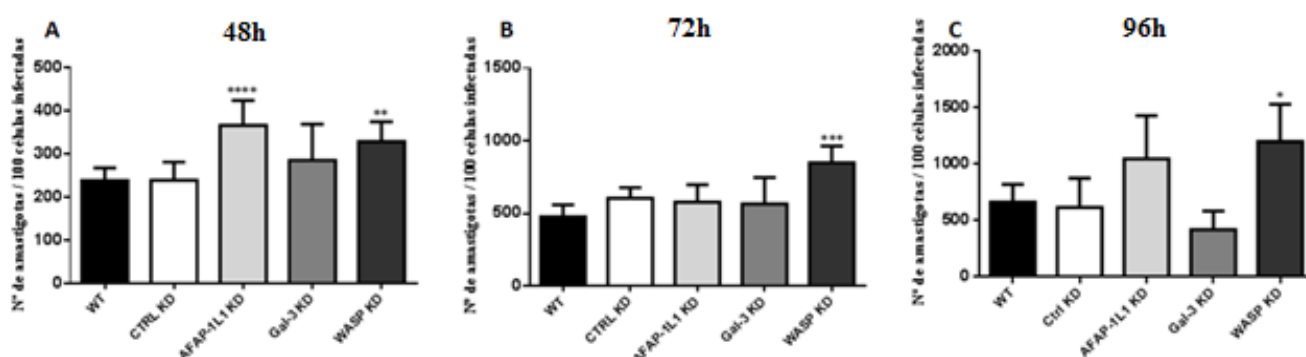


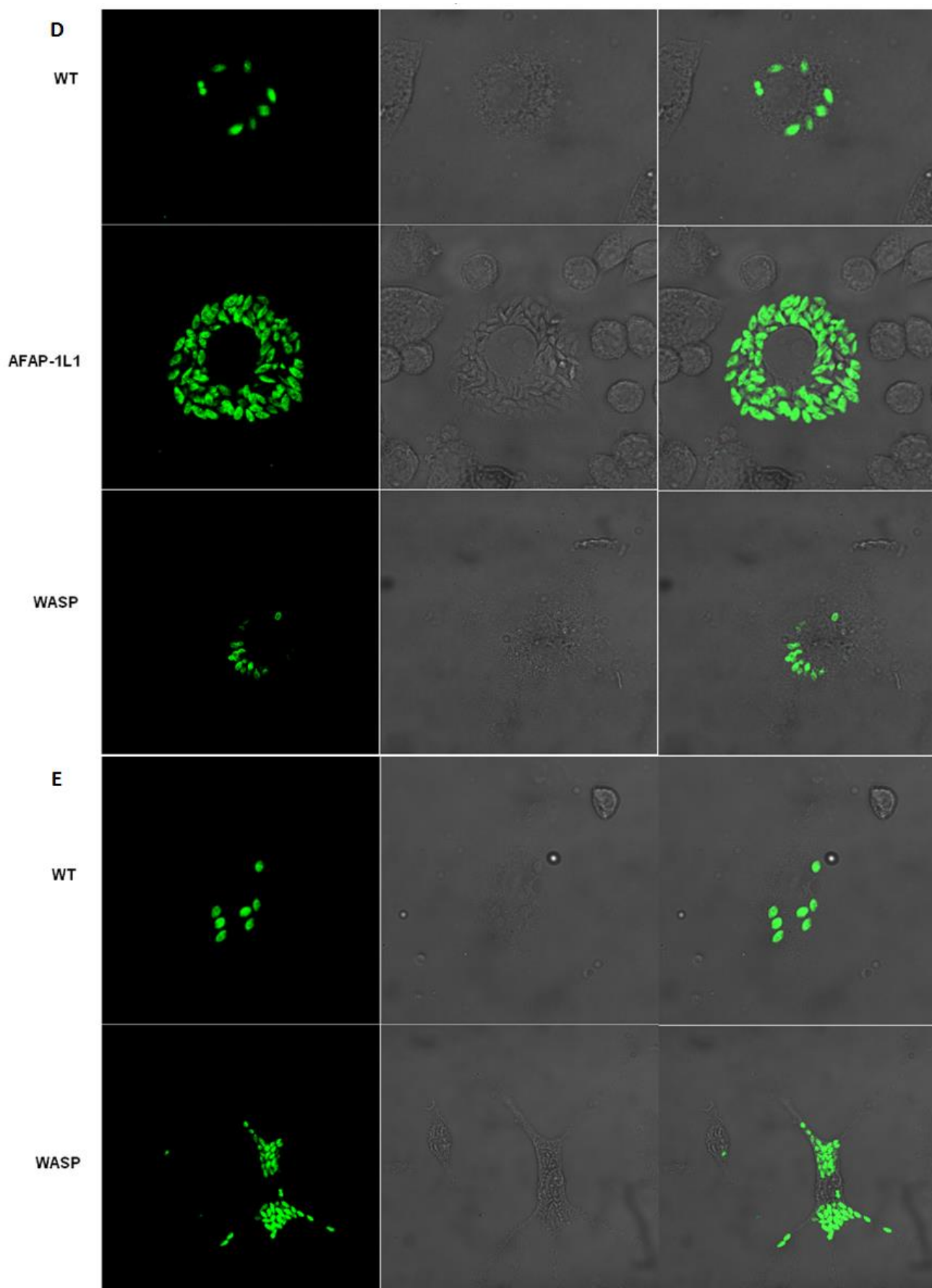
Figura 3. Ensaio de invasão celular de iMo com cepa G de *T. cruzi*. (A) Porcentagem de células infectadas em invasão com amastigotas extracelulares. Não observamos diferença na invasão celular entre as linhagens *knockdown* para AFAP-1L1, Galectina-3 e WASP com as linhagens controle (WT e CTRL KD). **(B)** Relação entre número de parasitas/número de células infectadas. Não observamos diferença na

quantidade de parasitas dentro das células infectadas em todas as linhagens estudadas. **(C)** Porcentagem de células infectadas em invasão com tripomastigotas de cultura de tecido. Observamos que as células *knockdown* para WASP apresentaram reduzida ($**p<0,01$) invasão celular quando comparadas com a linhagem selvagem (WT), sugerindo uma importância desse componente durante a invasão por tripomastigotas. **(D)** Relação entre número de parasitas/número de células infectadas da invasão com tripomastigotas. Não observamos diferença na quantidade de parasitas dentro das células infectadas em todas as linhagens estudadas. Experimentos foram realizados em duplicata em dois experimentos independentes.

Na Figura 4 temos os ensaios de multiplicação realizados com as linhagens obtidas nos tempos de 48 horas (A), 72 horas (B) e 96 horas (C). No tempo de 48 horas (A e D) podemos observar o aumento do número de amastigotas intracelulares, em relação ao controle selvagem (WT), das células *knockdown* para AFAP-1L1 ($****p<0,0001$) e WASP ($**p<0,01$) sugerindo uma maior facilidade para multiplicação na reduzida expressão dessas proteínas. Não houve diferença nas células deficientes para Galectina-3. No tempo de 72 horas (B e E) a diferença existente no tempo de 48 horas entre células AFAP-1L1 *knockdown* e os controles desaparece, mantendo-se apenas o aumento de multiplicação em WASP *knockdown* ($***p<0,001$). No último tempo analisado (C, 96 horas e F) apenas WASP *knockdown* apresentou aumento da multiplicação significativa ($*p<0,05$), estranhamente observamos uma estagnação na multiplicação de Galectina-3 talvez decorrente de uma menor redução no nível de expressão proteica desse *knockdown*.

Figura 4.





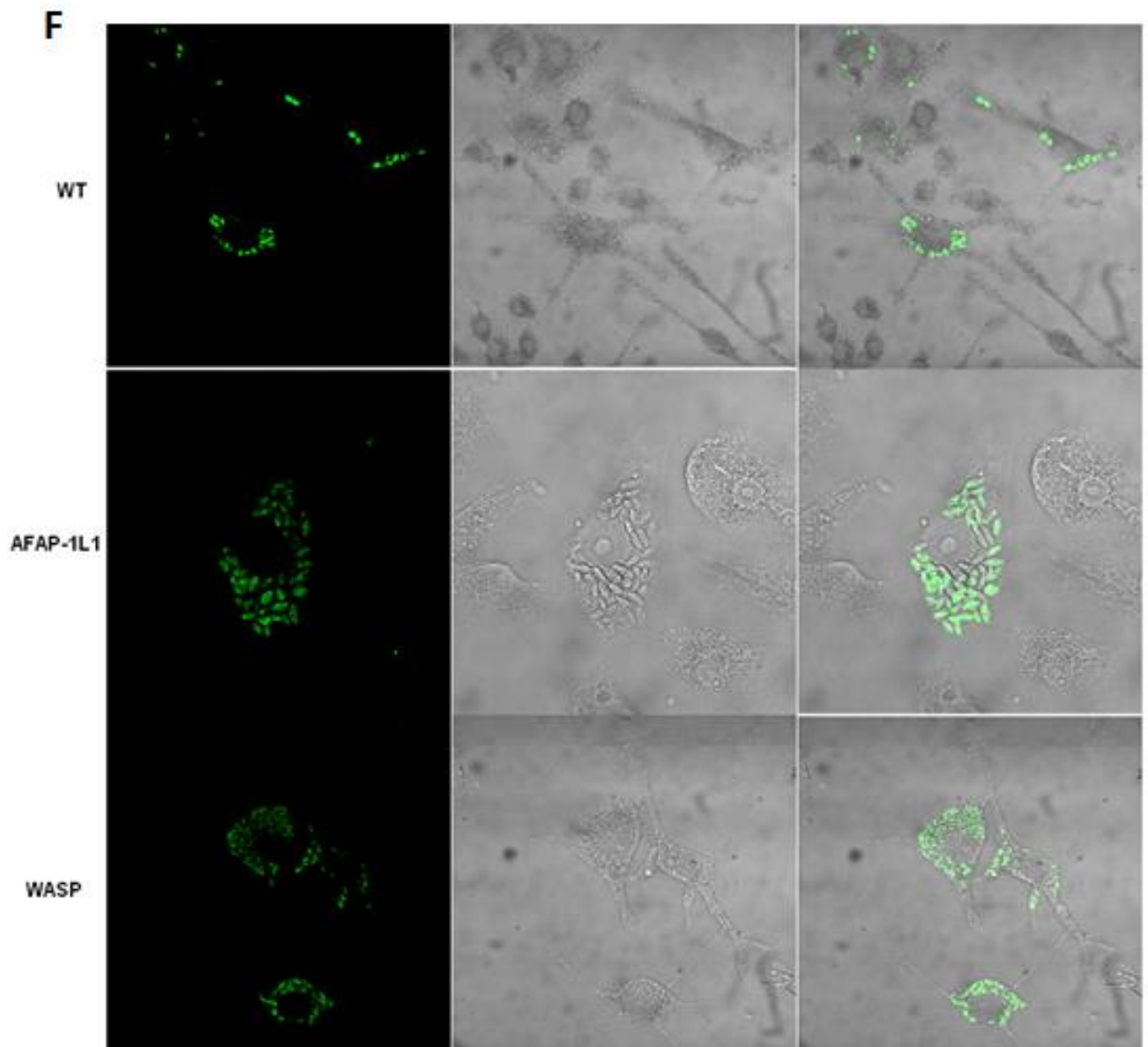


Figura 4. Ensaio de multiplicação celular em iMo. (A) Multiplicação no tempo de 48 horas. Células *knockdown* para AFAP-1L1 e WASP apresentaram aumentada multiplicação intracelular comparadas com controle selvagem (WT) e controle de transdução (CTRL KD), $p < 0,0001$ e $p < 0,01$, respectivamente. Não houve diferença em Galectina-3 *knockdown*. **(B)** Multiplicação no tempo de 72 horas. AFAP1-L1 *knockdown* deixou de apresentar diferença significativa e somente WASP *knockdown* ($p < 0,001$) apresentou aumentada multiplicação. **(C)** Multiplicação no tempo de 96 horas. WASP *knockdown* mantém crescimento aumentado ($p < 0,05$) enquanto AFAP1-L1 *knockdown* apresenta tendência de aumento da multiplicação. Galectina-3

knockdown não apresentou diferença. **(D)** Imunofluorescência do tempo de 48 horas para as células. Podemos observar o visível aumento na quantidade de parasitas intracelularmente em AFAP-1L1 *knockdown* e WASP *knockdown* quando comparado com as células WT. **(E)** Imunofluorescência do tempo de 72 horas. Podemos observar o visível aumento na quantidade de parasitas intracelularmente em e WASP *knockdown* quando comparado com as células WT. **(F)** Imunofluorescência do tempo de 96 horas. Podemos observar o visível aumento na quantidade de parasitas intracelularmente em AFAP-1L1 *knockdown* e WASP *knockdown* quando comparado com as células WT. Experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes.

4.3. AFAP-1L1, Galectina-3 e WASP participam do mecanismo regulador do citoesqueleto de actina durante o tratamento com P21-His₆?

Observamos em estudos prévios que a P21-His₆ é capaz de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 (RODRIGUES *et al.*, 2012). Neste contexto, empregamos o modelo de *knockdown* para avaliarmos a importância das proteínas AFAP-1L1, galectina-3 e WASP na atividade pró-fagocítica da P21-His₆. Para avaliar se o *knockdown* dessas proteínas afetaria a polimerização do citoesqueleto de actina as células obtidas foram tratadas ou não com a P21-His₆, cuja atividade na polimerização de actina já foi descrita (RODRIGUES *et al.*, 2012). Após o tratamento as células foram marcadas com Faloidina-TRITC, e analisadas por citometria para verificar a intensidade da fluorescência correspondendo à intensidade da polimerização do citoesqueleto de actina (Figura 5). Como a polimerização de actina provocada pela P21-His₆ continuou acontecendo em todas células *knockdown*, observado pelo aumento da intensidade média de fluorescência quando se tratando as células. O resultado sugere que as proteínas estudadas não estão envolvidas no efeito biológico polimerizados da P21-His₆.

Figura 5.

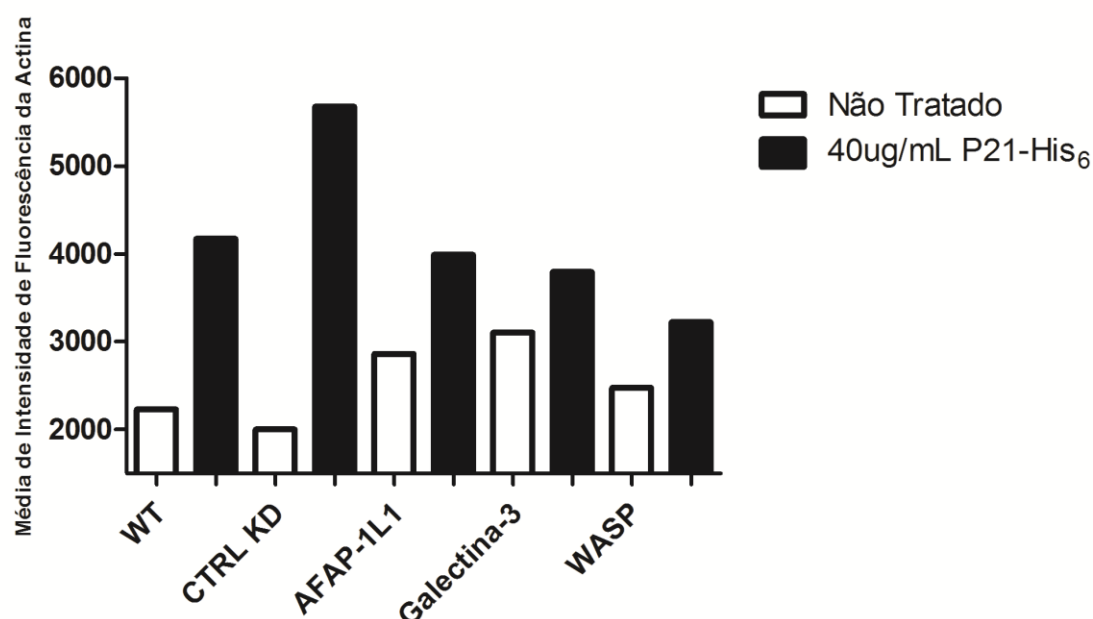


Figura 5: Intensidade média de fluorescência para actina após tratamento com P21-His₆ em células *knockdown*. Células *knockdown* com P21-His₆. Observamos que todas as células *knockdown* produziram uma maior intensidade de fluorescência para a marcação de actina sugerindo pouca ou nenhuma participação na polimerização de actina produzida pela P21-His₆ já que um aumento na fluorescência continuou se dando quando as células eram tratadas. Resultados representativos de dois experimentos realizados independentemente.

Posteriormente, empregamos a tecnologia de *biopanning* em busca de peptídeos miméticos ao receptor CXCR4, bem como outros possíveis ligantes da P21.

4.4. Obtenção de Bacteriófagos Ligantes à P21-His₆ com Capacidade de Interferência nos Efeitos Biológicos da Proteína.

Procurando por potenciais ligantes para a proteína P21-His₆ realizamos um *Biopanning* utilizando a técnica de *Phage Display* que consiste em utilizar uma biblioteca de bacteriófagos para descobrir sequências de aminoácidos mimetizantes de regiões nas proteínas ligantes. Dessa forma obtemos 17 fagos, listados na Tabela 1 em ordem crescente de Absorbância no ELISA *deep-well*, capazes de interagir com a proteína P21-His₆. Para selecionar os mais interativos, um ELISA *deep-well* (feito com o sobrenadante da cultura dos bacteriófagos) foi realizado e pudemos selecionar os oito fagos (A1, A6, A11, B2, B9, B10, C2 e C3, nomeados segundo os poços da placa de 96

onde cresceram para a extração de DNA) mais reativos para um ELISA com os bacteriófagos purificados (Figura 6).

Tabela 1. Absorbância média por ELISA *deep-well* dos bacteriófagos isolados.

Absorbância Média	Bacteriófago
0,966	A6
0,841	A1
0,823	A11
0,804	B9
0,784	B10
0,746	B2
0,738	C3
0,737	C2
0,698	B4
0,697	A9
0,676	B11
0,629	C1
0,593	B12
0,390	A3
0,319	Selv*
0,282	C4
0,248	A5
0,245	A10
0,221	Só P21-His ₆
0,093	Branco

*Bacteriófago Selvagem, sem cauda de peptídeos randômicos.

Figura 6

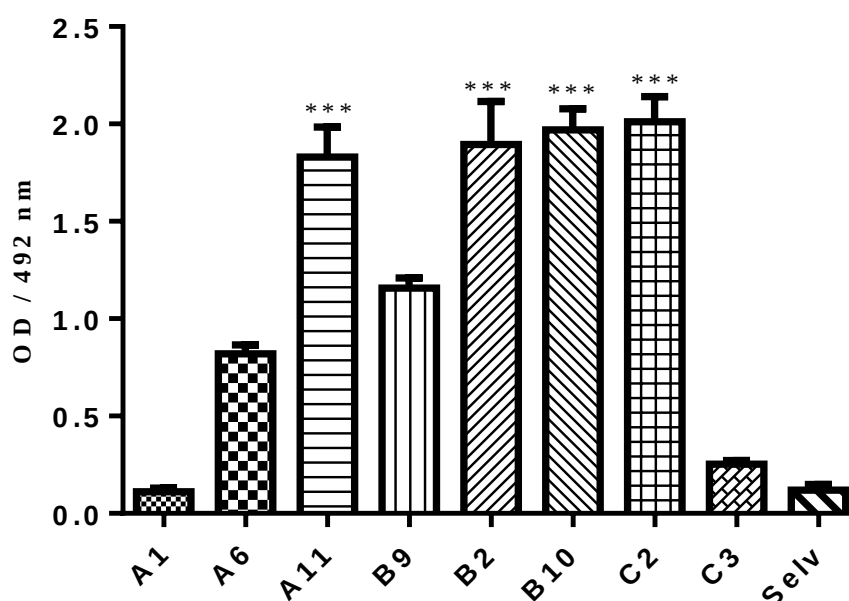
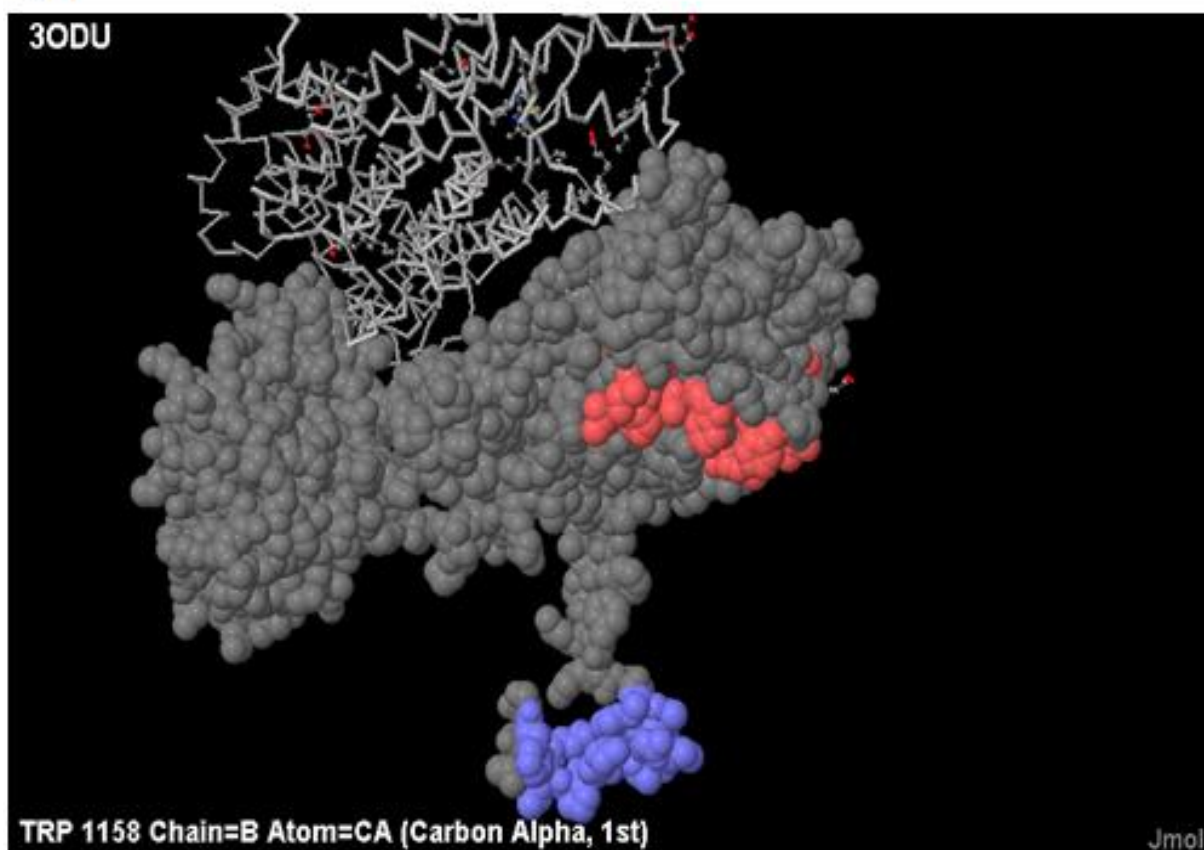


Figura 6. ELISA com bacteriófagos mais reativos purificados. Os clones que apresentaram as maiores interações com P21-His₆ por absorvância a 492 nm foram A11 (A = 1.82), B2 (A = 1.89), B10 (A = 1.96), C2 (A = 2.01). A6 e B9 também apresentaram boa interação, A = 0.81 e A = 1.15, respectivamente. Bacteriófago Selvagem (Selv) apresentou absorvância de A = 0.12. ***p<0,001.

Nossos resultados prévios (RODRIGUES *et al.*, 2012) mostraram que o receptor de quimiocina CXCR4 é um dos receptores para a proteína P21-His₆, dessa forma procuramos analisar as sequências dos quatro clones mais reativos à proteína recombinante com a sequência da proteína CXCR4 (obtida pela ferramenta *Protein Data Bank*, disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3ODU>). Como podemos ver na Figura 7 (A), obtida pela ferramenta *Pepsurf* (Disponível em: <http://pepitope.tau.ac.il/>), houve alinhamento entre as sequências. As esferas cinza correspondem a aminoácidos da cadeia B da proteína CXCR4 e as esferas vermelhas correspondem às sequências pareadas com os clones B2, B10 e C2, enquanto as esferas azuis correspondem às sequências pareadas com o clone A11. Na Figura 8 (B), podemos ver em detalhe o pareamento da sequência de aminoácidos do CXCR4 com a sequência do clone A11, observando 10 *matches* (pareamento ideal) e 2 *mismatches* (pareamento não ideal). B2, B10 e C2 apresentaram *matches* com 6, 7 e 8 aminoácidos, respectivamente, e 3, 2 e 2 *mismatches*, respectivamente.

Figura 7.

A



B

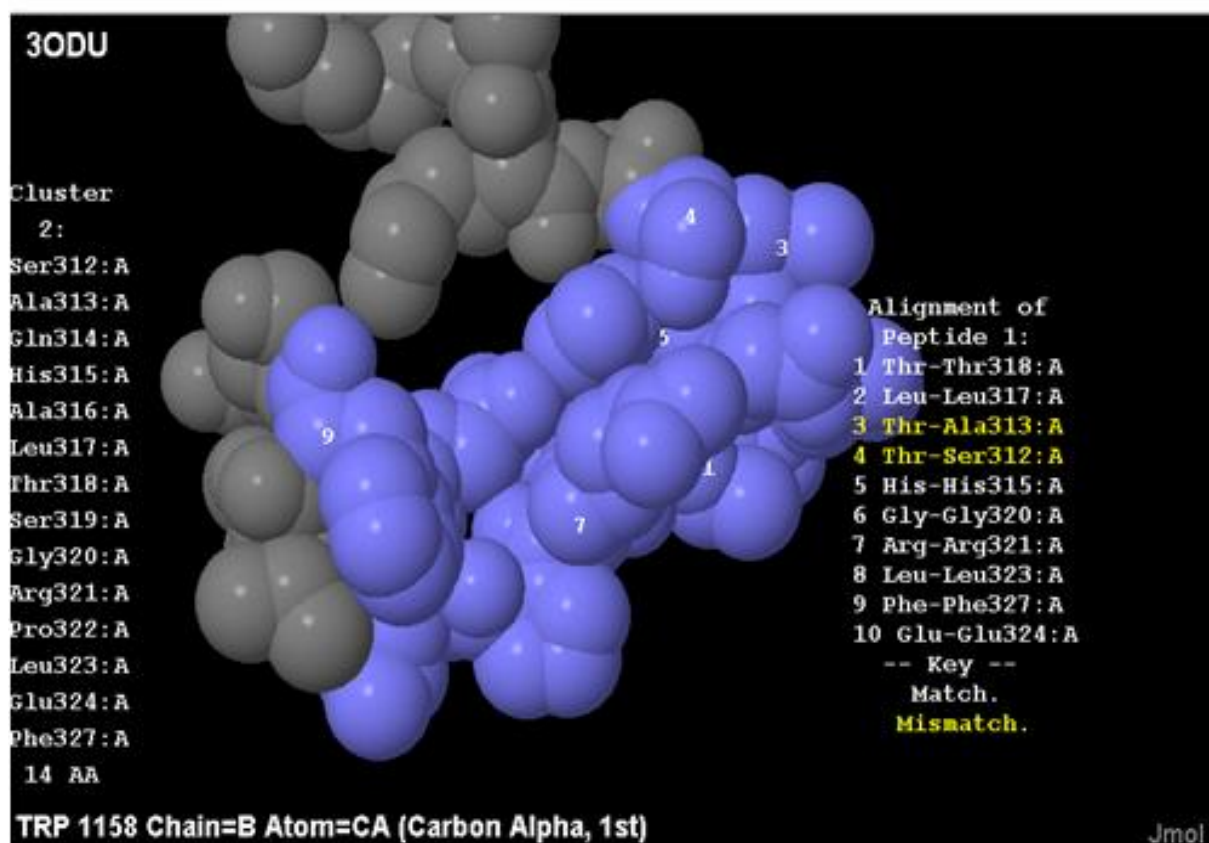


Figura 7. Análise de similaridade estruturais entre o CXCR4 e os bacteriófagos selecionados. (A) Similaridades entre os clones A11, B2, B10 e C2 e o receptor de quimiocinas CXCR4. As esferas em cinza representam os aminoácidos da cadeia B do receptor CXCR4, enquanto as esferas azuis representam os aminoácidos pareados do bacteriófago A11 e as esferas vermelhas os aminoácidos pareados dos bacteriófagos B2, B11 e C2. **(B)** Alinhamento entre CXCR4 e bacteriófago A11. O clone A11 (esferas azuis) apresentou um pareamento perfeito (*macth*) em 10 dos 12 aminoácidos do bacteriófago, e dois pareamentos não ideais (*mismatches*) trocando Treonina (Thr) por Alanina (Ala) e Serina (Ser) com CXCR4.

Decidimos testar o potencial inibitório que os bacteriófagos teriam sobre a invasão do *T. cruzi* e sobre a fagocitose aumentada causada pela P21-His₆. Dessa forma realizamos ensaios de invasão onde diferentes quantidades de bacteriófagos foram incubados previamente com formas tripomastigotas da cepa G (Figura 8A) ou com P21-His₆ (Figura 8B) por 2 horas em T.A. e sob agitação. Observamos, em 8A, que o tratamento das formas tripomastigotas com os bacteriófagos A11 e B2, nas concentrações de 10⁶, 10⁴ ou 10² de bacteriófagos por parasita, foram capazes de reduzir a invasão (**p<0,01 e *p<0,05) em células C2C12, com exceção da quantidade de 10² para o bacteriófago B2. Em 8B, observamos que a incubação de 40µg/mL de P21-His₆ com formas de *T. cruzi* aumentaram a invasão tanto nos controles não incubados com fagos quanto na incubação com o fago irrelevante “Selvagem”. Enquanto a incubação da proteína com 10¹² bacteriófagos A11 ou B2 produziu uma redução significativa (**p<0,01 e *p<0,05) no efeito pró-fagocítico da P21-His₆ sugerindo uma competição com a mesma e uma inibição do seu efeito biológico.

Figura 8.

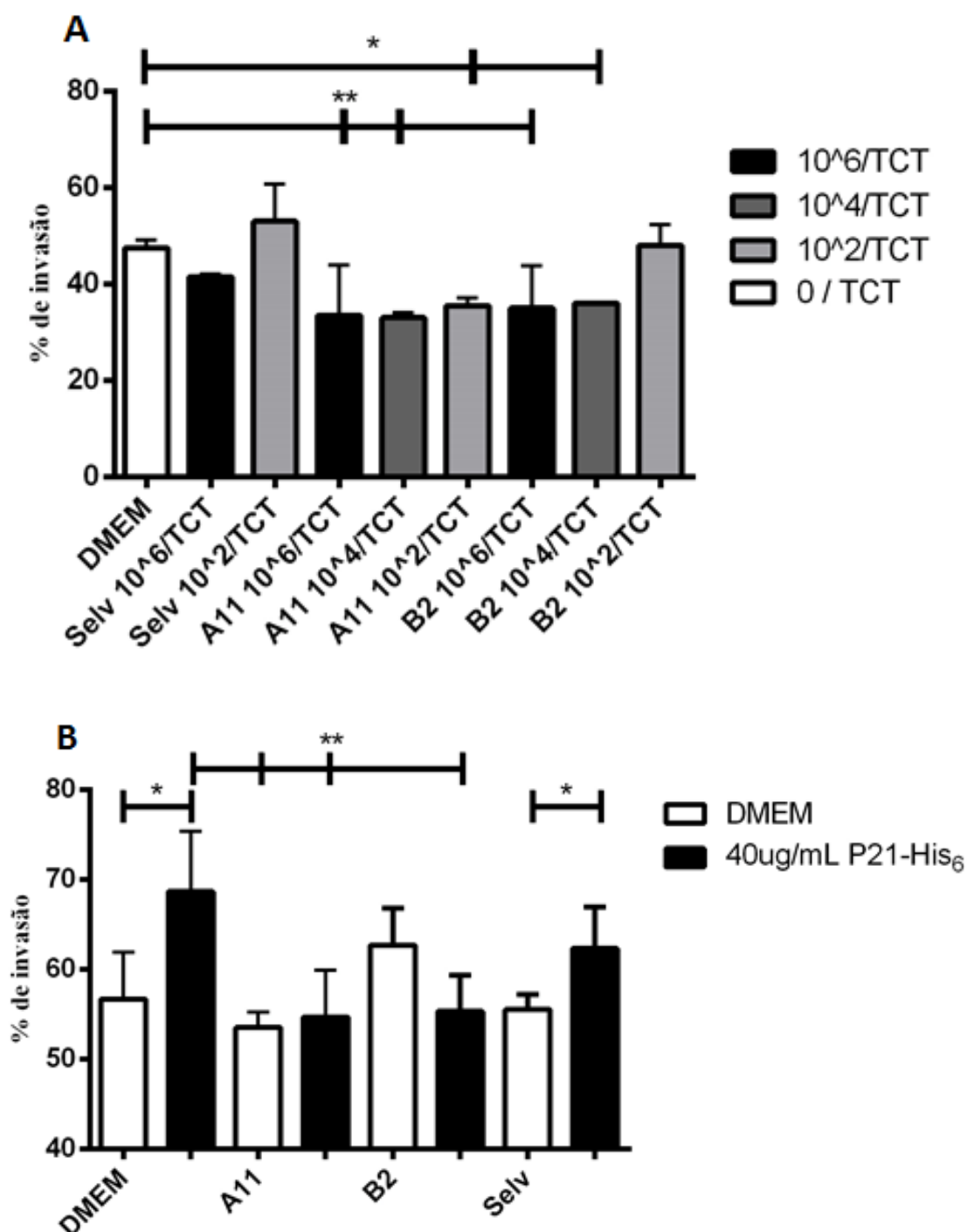


Figura 8. Efeitos biológicos dos bacteriófagos específicos durante a invasão por *T. cruzi* e no efeito da P21-His₆. (A) Controle da invasão celular em mioblastos C2C12 por tripomastigotas da cepa G incubados previamente com os bacteriófagos selecionados contra P21-His₆. A11 e B2 foram capazes de reduzir a invasão por tripomastigotas em diferentes proporções bacteriófagos:parasita. Podemos observar que a incubação de 10⁶, 10⁴ e 10² bacteriófagos A11 reduziu a invasão ao se comparar com o controle DMEM, assim como a incubação com as maiores quantidades (10⁶ e 10⁴) de

B2 produziu o mesmo efeito inibitório (** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$). Bacteriófagos selvagens não foram capazes de reduzir a invasão mesmo com as maiores proporções. **(B)** Controle do efeito pró-fagocítico (* $p < 0,05$ DMEM e em incubados com fagos “Selv”) da P21-His₆ pelos bacteriófagos selecionados. A11 e B2 foram capazes de reverter os efeitos pró-fagocíticos da P21-His₆ (** $p < 0,01$) enquanto o fago selvagem não afetou o efeito pró-fagocítico da P21-His₆. Experimentos feitos em duplicatas e em dois ensaios independentes.

4.5. Atividade Quimiotática e Invasiva da P21-His₆.

Conhecendo a atividade quimiotática do receptor CXCR4 (Murdoch, 2007), e suspeitando da sua interação com a P21-His₆ resolvemos realizar experimentos *in vivo* para avaliar os efeitos biológicos da proteína recombinante.

Inicialmente injetamos intraperitonealmente a dose estabelecida no modelo *in vitro* de 40µg/mL de P21-His₆ (RODRIGUES *et al.*, 2012) em animais Balb/c para acompanharmos o recrutamento celular em diferentes tempos na cavidade abdominal. A quantidade total de células recrutadas nos tempos de 6, 24 e 72 horas pós-tratamento foi contado em câmara de Neubauer (Figura 9A), e podemos observar que o tratamento com P21-His₆ aumenta significativamente o número de células na cavidade abdominal quando comparado com os animais tratados apenas com PBS. Sugerindo assim uma atividade quimiotática *in vivo* para a P21-His₆.

Uma gota do lavado peritoneal foi fixada com metanol e corada com Giemsa para contagem diferencial entre polimorfonucleares (PMN), macrófagos (MO) e linfócitos (LO) por microscopia de luz, confirmatoriamente, a mesma amostra foi fixada em formaldeído 4% e conduzida à análise por citometria de fluxo para separação das populações de macrófagos, linfócitos e polimorfonucleares apenas pelo tamanho e granulosidade das células. O resultado dessa contagem diferencial pode ser observada em porcentagem na Figura 9B, onde podemos ver que o perfil de células recrutado ao longo do tratamento com P21-His₆ parece ser de linfócitos e macrófagos, enquanto a porcentagem total de neutrófilos reduz, indicando uma redução relativa dessa população no total de células.

Figura 9.

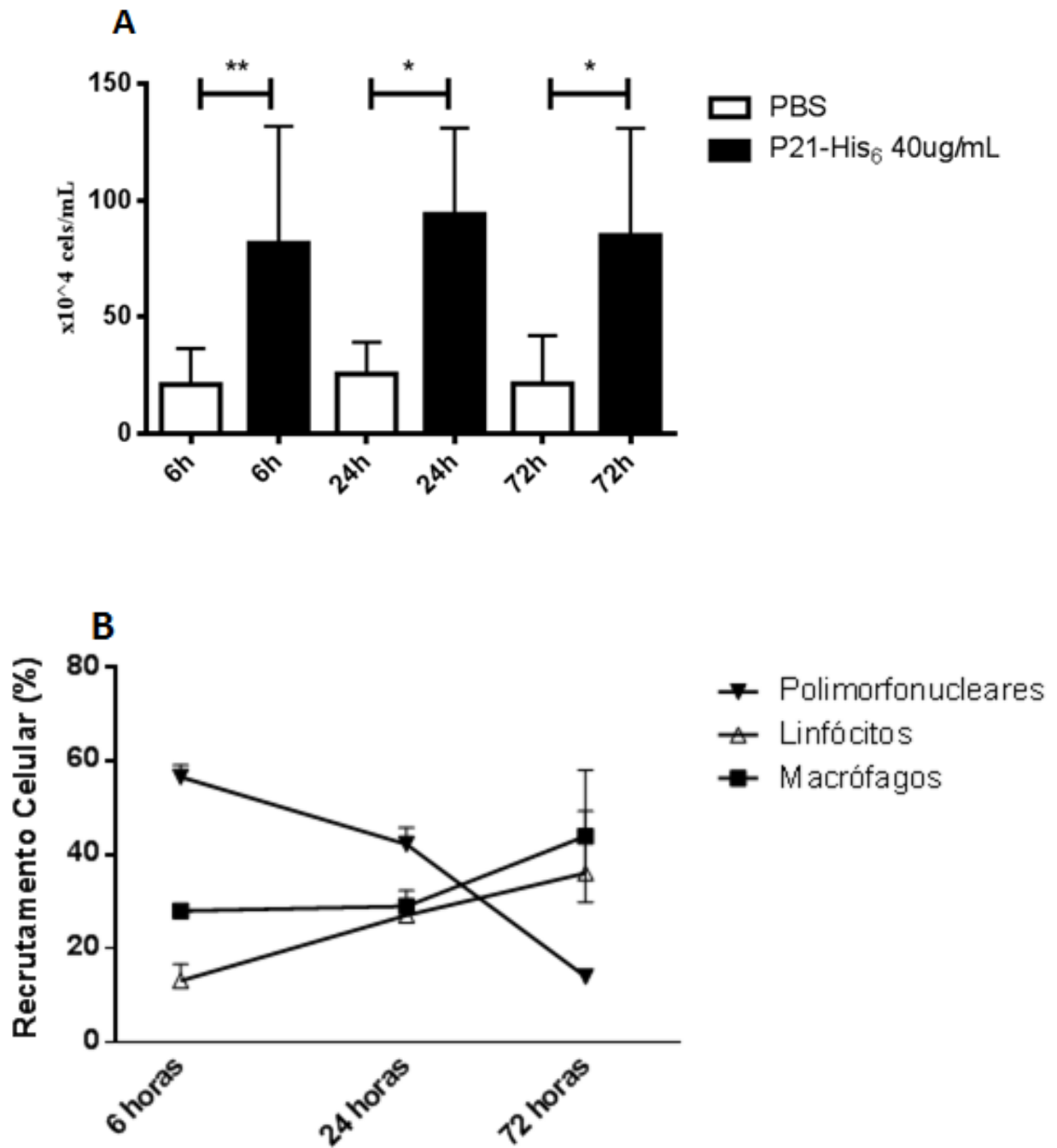


Figura 9. Quimiotaxia *in vivo* causada pela proteína P21-His₆. (A) Recrutamento celular intraperitonealmente em camundongos Balb/c. Podemos observar que a injeção intraperitoneal com 40µg/mL de P21-His₆ produziu um maior recrutamento de células totais para essa cavidade quando comparado com a injeção de PBS. (B) Citometria de fluxo para diferenciação em PMN, MO e LO. Observamos que o recrutamento de linfócitos e macrófagos parece aumentar à medida que o número de neutrófilos vai

reduzindo, sugerindo uma troca de população recrutada. Experimentos realizados em triplicatas e em dois ensaios independentes.

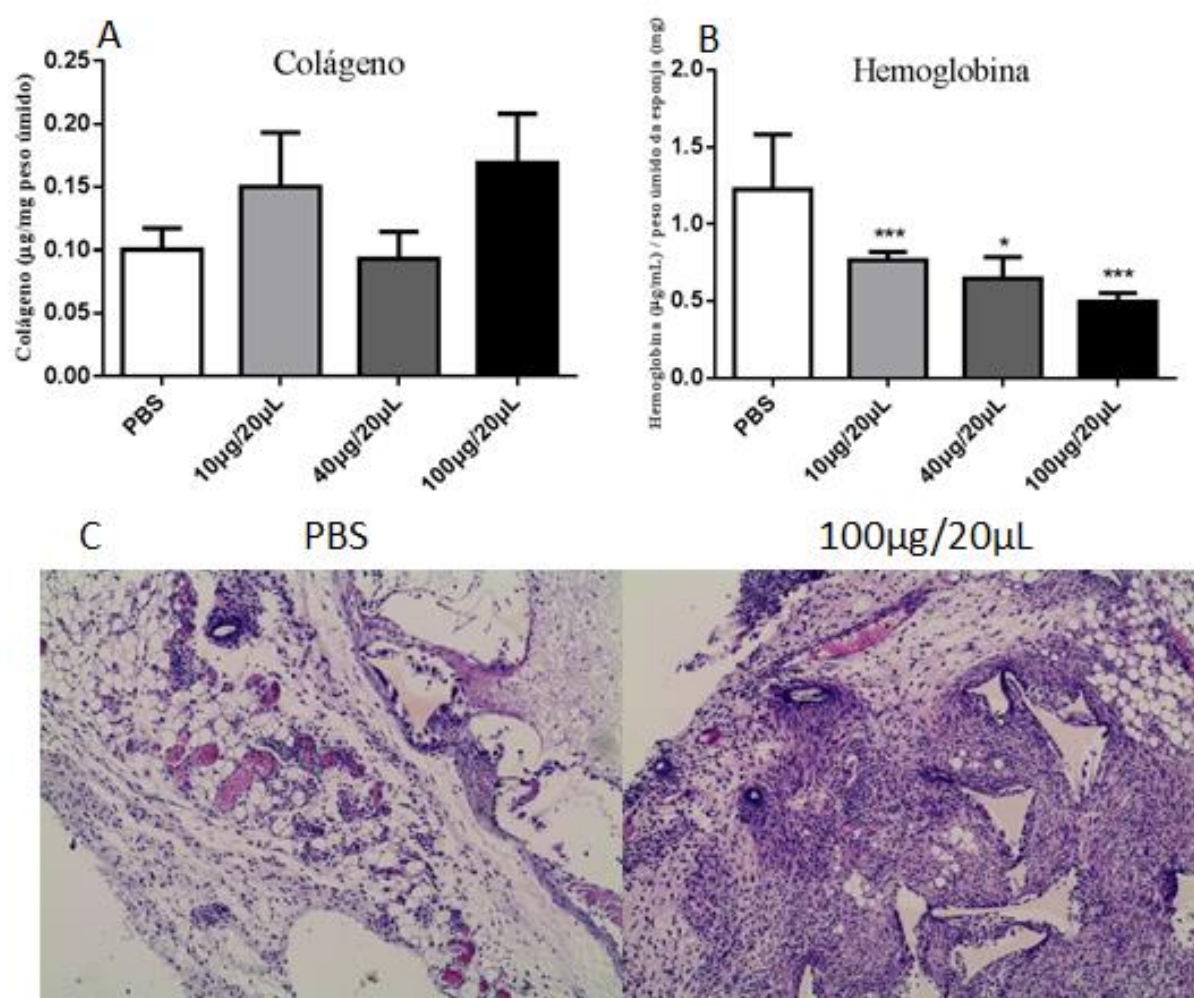
4.6. Efeitos Anti-Angiogênicos e Ativadores da P21-His₆.

Procurando estudar outros efeitos biológicos *in vivo* do tratamento com P21-His₆, decidimos utilizar a metodologia de esponjas, padronizada por Bailey *et al.*, 1988 e Grindlay *et al.*, 1951. Dessa forma, pequenas esponjas foram cirurgicamente inseridas nas costas de camundongos C57Bl/6 e o tratamento com diferentes doses de P21-His₆ (10µg, 40µg ou 100µg) foi realizado injetando-se 20µl de solução nas esponjas a cada 72 horas (dia 1, 4 e 7) durante nove dias (Figura 10) para investigação da melhor dose-resposta a ser estudada na fase crônica da inflamação. As esponjas foram removidas cirurgicamente e submetidas a análises bioquímicas para análise do conteúdo de colágeno (A), presente em processos de reparo celular durante a inflamação, de hemoglobina (B), marcador relativo da existência e formação de vasos sanguíneos, da enzima mieloperoxidase (MPO, D), expressa por neutrófilos ativados e da enzima N-Acetilglucosaminidase (NAG, E), expressa em macrófagos ativados. Esponjas particulares foram processadas histologicamente e podemos observar uma coloração de HE em C.

Na Figura 10A, a quantidade de colágeno nas amostras foi determinada para avaliar se os processos de reparo celular decorrente da inflamação estariam alterados. Podemos observar que houve aumento, mas não chegou a ser significativo. Na Figura 10B podemos ver o resultado da dosagem de hemoglobina mostrando-se que houve uma redução no seu conteúdo com o tratamento de qualquer dose de P21-His₆ (*p<0,05 e ***p<0,001), sugerindo que a proteína recombinante estaria agindo de maneira anti-angiogênica, reduzindo a produção de vasos sanguíneos decorrente do processo inflamatório de corpo estranho. Em C podemos ver um corte histológico corado com HE onde um maior número de vasos sanguíneos pode ser observado na esponja tratada com PBS (painel esquerdo), corroborando o dado bioquímico, e um maior número de células recrutadas pode ser observada na esponja tratada com 100µg/20µL de P21-His₆ (painel direito), reforçando os dados quimiotáticos e bioquímicos. Em D e E foram analisados se os neutrófilos e macrófagos, respectivamente, recrutados em animais tratados com P21-His₆ estariam relativamente mais ativos que em animais tratados com

PBS. Podemos observar (em D), que parece haver um aumento da atividade da enzima MPO à medida que a dose de P21-His₆ é aumentada, sendo que na maior concentração testada de 100µg/20µL houve um aumento significativo (***p<0,001), demonstrando que os neutrófilos recrutados naquelas esponjas estavam mais ativos. Em E podemos observar que o tratamento com qualquer dose de P21-His₆ produziu uma maior ativação relativa de macrófagos (*p<0,05 e **p<0,01) em todas as concentrações testadas, mostrando que a ativação de macrófagos é maior durante a exposição a P21-His₆.

Figura 10.



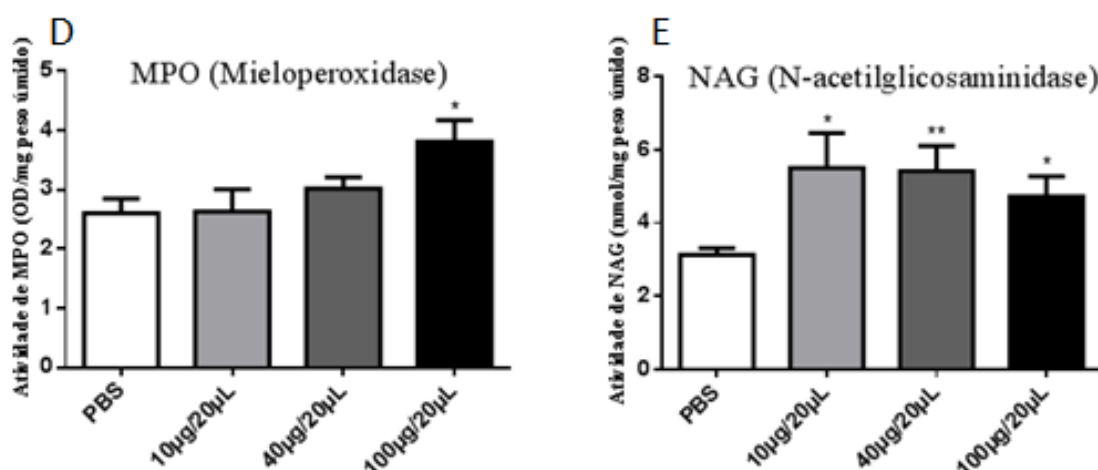


Figura 10. Efeitos biológicos da P21-His6 durante a inflamação crônica (nove dias).

(A) Conteúdo em µg de colágeno por mg de peso úmido da esponja obtida. Observamos que não houve diferença entre o tratamento com P21-His₆ e o tratamento controle de PBS. (B) Concentração de hemoglobina (µg/mL) por mg de peso úmido da esponja obtida. Observamos que houve uma redução significativa (**p<0,001 para 10µg/20µL e 100µg/20µL e *p<0,05 para 40µg/µL) no conteúdo de hemoglobina quando houve tratamento com P21-His₆ sugerindo um efeito anti-angiogênico para a proteína. (C) Análise Histológica corada com Hemataoxilina-Eosina. Esponjas tratadas com PBS (painel esquerdo) e com 100µg/20µL de P21-His₆ (painel direito) nos mostram maior volume de vasos sanguíneos e hemácias no painel esquerdo e maior densidade de recrutamento celular no painel direito. (D) Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) produzida por neutrófilos ativados. Observamos um aumento da atividade da enzima de MPO após o tratamento com P21-His₆ na dose de 100µg/20µL sugerindo uma maior atividade e/ou um maior recrutamento de neutrófilos para a esponja tratada. * p<0,05. (E) Atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) produzida por macrófagos ativados. Observamos um aumento (**p<0,01 na dose 40µg/20µL e *p<0,05 nas doses de 10 e 100µg/20µL) da atividade da enzima de NAG após o tratamento com P21-His₆ sugerindo uma maior atividade e/ou um maior recrutamento de macrófagos para a esponja tratada. N=10 C57Bl/6.

Posteriormente resolvemos investigar a atuação da proteína P21-His₆ durante a fase aguda (um dia) da inflamação. Dessa maneira realizamos o mesmo experimento, dessa vez tratando apenas com a dose 100µg/20µL, julgada ter obtido mais resultados, e sacrificando os animais após um dia de tratamento. Podemos ver os resultados obtidos

na Figura 11 que, assim como visto durante a fase crônica (nove dias) de inflamação, não houve aumento do conteúdo de colágeno (11A), enquanto a quantificação de hemoglobina (11B) mostrou uma redução significativa ($p < 0,05$) desse material sugerindo uma menor vascularização e angiogênese na esponja. Da mesma forma observamos que as atividades de MPO (11C), característica da ativação de neutrófilos, também aumentaram significativamente ($p < 0,05$) e NAG (11D), característica da ativação de macrófagos, também aumentou significativamente ($p < 0,05$), sugerindo um maior recrutamento e/ou atividade dessas células durante o processo inflamatório produzido pela implantação da esponja.

Figura 11.

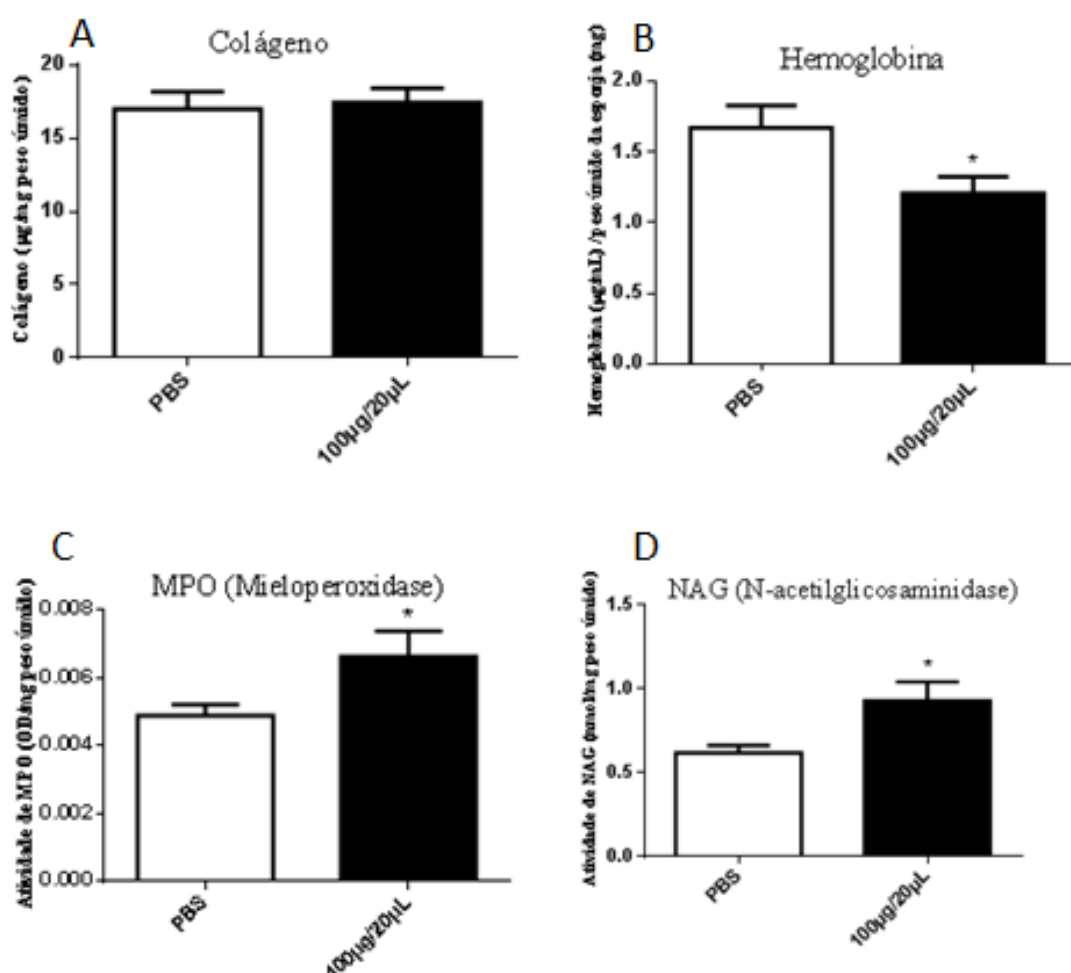


Figura 11. Efeitos biológicos da P21-His6 durante a inflamação aguda. (A) Conteúdo em µg de colágeno por mg de peso úmido da esponja obtida. Observamos que não houve diferença entre o tratamento com 100µg/20µL de P21-His₆ e o tratamento

controle de PBS. **(B)** Concentração de hemoglobina ($\mu\text{g/mL}$) por mg de peso úmido da esponja obtida. Observamos que houve uma redução significativa ($*p<0,05$) no conteúdo de hemoglobina quando houve tratamento com P21-His₆ sugerindo um efeito anti-angiogênico para a proteína. **(C)** Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) produzida por neutrófilos ativados. Observamos um aumento da atividade da enzima de MPO após o tratamento com P21-His₆ sugerindo uma maior atividade e/ou um maior recrutamento de neutrófilos para a esponja tratada. $* p<0,05$. **(D)** Atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) produzida por macrófagos ativados. Observamos um aumento da atividade da enzima de NAG após o tratamento com P21-His₆ sugerindo uma maior atividade e/ou um maior recrutamento de macrófagos para a esponja tratada. $* p<0,05$. N=10 C57Bl/6.

5. Discussão

5.1. Galectina-3 Participa do Tráfego Intracelular do *T. cruzi* e Produz Estruturas do Tipo G3CS.

Nossos resultados demonstraram que a proteína galectina-3 está presente ao redor do parasita durante o seu tráfego intracelular (Figura 1A e 1B) reforçando sua participação no processo de invasão celular. A galectina-3 é uma proteína com atividade lectínica capaz de ligar a carboidratos e possui caracterizada participação em eventos como balsas lipídicas, *ruffles* de membrana e outras vias endocíticas (PAZ *et al.*, 2010 e HSU *et al.*, 2009). Estudos com *T. cruzi* já demonstraram que a galectina-3 facilita a adesão celular do parasita (KLESHCHENKO *et al.*, 2004 e MOODY *et al.*, 2000) e que o *T. cruzi* tem a capacidade de mobilizar as balsas lipídicas para invadir as células do hospedeiro (FERNANDES *et al.*, 2007). Sugerindo assim que o *T. cruzi* pode mobilizar as balsas lipídicas via sua interação com a galectina-3.

Em nosso estudo verificamos que a galectina-3 participa do processo de invasão celular por *T. cruzi* em 20% dos casos (1B), estando presente em expansões citoplasmáticas associadas à invasão como os *ruffles* e em estruturas em formato de cálice ricas em actina, e também podendo ser considerada como marcador de lise do vacúolo parasitóforo ao formar estruturas contendo galectina-3 (G3CS) polarizada que vão desaparecendo ao longo do tempo (1C) (MACHADO *et al.*, 2013). Essa formação de G3CS parece depender da atividade lectínica da galectina-3 e sua ação se dá pela interação com resíduos do vacúolo lisado (PAZ *et al.*, 2010), sugerindo um marcador de escape do fagossomo.

5.2. AFAP1-L1 e WASP são Proteínas Associadas com a Invasão e Multiplicação do *T. cruzi*.

Sabendo da importância do citoesqueleto de actina para a infecção de patógenos no geral (CASTELLANO *et al.*, 2001), e por *T. cruzi* (MORTARA *et al.*, 1991 e PROCÓPIO *et al.*, 1998) e da interação dessas proteínas com o citoesqueleto e com o parasita, levantamos a hipótese de que a estudada galectina-3, a proteína WASP – um dos componentes essenciais da polimerização da actina (MASSAAD *et al.*, 2013) – e a proteína AFAP-1L1 – proteína adaptadora capaz de realizar *cross-links* de actina

(KAJITA *et al.*, 2013) – poderiam estar também relacionadas aos eventos de multiplicação celular.

Dessa forma produzimos células *knockdown* para tais proteínas e estudamos sua interação com *T. cruzi* (Figura 2, 3 e 4) em tempos de 2, 48, 72 e 96 horas. Observamos que a redução da expressão das proteínas não afetou a invasão do parasita no tempo de 2 horas, mas que a baixa expressão da proteína WASP se mostrou capaz de permitir o aumento da multiplicação intracelular em todos os tempos (4A-F) estudados posteriormente e uma menor taxa de invasão celular nas células invadidas com tripomastigotas (3C). Assim como a redução da expressão de AFAP-1L1 promoveu um aumento significativo no tempo de 48 horas, sugerindo sua importância em tempos iniciais pós-invasão celular. A partir desses resultados sugerimos que a ausência desses fatores prejudica a dinâmica de polimerização do citoesqueleto de actina e decorrente desse fenômeno o citoplasma do parasita fica mais frouxo, facilitando sua multiplicação intracelular, indo de acordo com a literatura onde já foi visto a importância da integridade do citoesqueleto de actina para a manutenção da infecção (FERNANDES *et al.*, 2011) e com o que previamente observamos, onde um citoesqueleto mais rígido produzia menor multiplicação intracelular (MARTINS, 2013).

A AFAP-1L1 é uma proteína adaptadora, recentemente caracterizada, com capacidade de se ligar à actina, cortactina e outras e de fazer *cross-links* entre essas moléculas, aumentando a estabilidade e melhorando a dinâmica do citoesqueleto (SNYDER *et al.*, 2011). Ela também participa em eventos de metástases sendo um fator importante na mobilidade das células cancerígenas (KAJITA *et al.*, 2013 e FURU *et al.*, 2011) dessa forma acreditamos que sua presença se faça necessária para a regulação do citoesqueleto de actina durante a reorganização do mesmo em processos de invasão. De forma semelhante, a proteína WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) é uma proteína de ligação à actina. É ativada pela proteína sinalizadora Cdc42 (ROHATGI *et al.*, 1999) e age pela ativação do complexo Arp 2/3 que participa da nucleação da actina (MACHESKY *et al.*, 1998). Sabendo que, a pouca expressão de WASP pode desequilibrar a dinâmica da regulação do citoesqueleto de actina, prejudicando a mobilidade celular (ESCUDERO-ESPARZA *et al.*, 2012), as vias endocíticas de reciclagem (XIE *et al.*, 2011) e a migração celular (CVEJIC *et al.*, 2008). Dessa forma acreditamos que o *knockdown* para a proteína WASP prejudicou a dinâmica do citoesqueleto de actina ao ponto de enfraquecê-lo e permitir uma maior multiplicação do

parasita. Já foi observado em outros modelos de *knockdown* para WASP que a integridade do citoesqueleto na manutenção do formato celular e no ciclo celular são afetadas (ZHANG *et al.*, 2009). Curiosamente observamos que o *knockdown* para WASP também reduziu a taxa de invasão celular pelas formas tripomastigotas, o que pode ser efeito de uma pior capacidade de regulação das vias endocíticas e de reparo (DE SOUZA *et al.*, 2013) – uma das formas de invasão do parasita - pelo citoesqueleto da célula.

Sabendo dos efeitos da P21-His₆ sobre o citoesqueleto de actina (RODRIGUES *et al.*, 2012) resolvemos estudar a interação entre essa proteína e as células *knockdown* obtidas. Realizamos experimentos visando avaliar se a polimerização de actina se mostrava afetada nessas células e se o tratamento com P21-His₆ apresentava o mesmo efeito pro-fagocítico previamente observado (Figura 5). Nossos resultados indicam que a ausência das proteínas AFAP-1L1, Galectina-3 e WASP reduziram pouco o efeito polimerizador da P21-His₆, sendo assim estes dados sugerem que o processo de sinalização celular induzido pela P21-His₆ de *T. cruzi* requer pouco participação destas proteínas para induzir a polimerização de actina e consequentemente promover a fagocitose.

5.3. Interação da P21-His₆ com Bacteriófagos e sua Inibição Específica.

O receptor CXCR4 é um receptor acoplado com a proteína G (*G protein-coupled receptor* - GPCR), um complexo que envolve sete domínios glicoprotéicos na membrana celular. As proteínas Gs são intermediárias essenciais para o mecanismo de transdução de sinal provenientes da superfície celular (FARFEL, 1999; SPIEGEL, 1996). Os GPCRs podem ser ativados por hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento, entre outros. Uma vez ativada, a proteína G intermedia o processo de sinalização que é iniciado com a ativação do GPCR e culmina com a resposta mediada pela ação de moléculas efetoras, tais como: canais iônicos e enzimas que geram segundos mensageiros, como, por exemplo, a adenilil-ciclase, a enzima que gera o mensageiro AMP cíclico.

Diversas cascatas de sinalização celular dependem da liberação do íon cálcio, estocado em organelas celulares (retículo endoplasmático, mitocôndria), para o

citoplasma. Uma vez ativada, a proteína G se separa e, sua subunidade α se desloca pela membrana plasmática e ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A fosfolipase C catalisa a quebra de um lipídeo de membrana, o fosfatidilinositolbifosfato (PIP2) em duas moléculas: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). O DAG permanece na membrana plasmática e, atua no recrutamento de uma proteína quinase, dependente de cálcio ou PKC. O IP3 se difunde pelo citoplasma e se associa a receptores presentes na membrana do retículo que são canais de cálcio. A ativação destes receptores leva a liberação do Ca^{++} presente no retículo para o citoplasma, onde ele participa da ativação da PKC e de várias outras proteínas relacionadas ao rearranjo do citoesqueleto, dentre elas a PI3-quinase, AKT, m-TOR e n-Ras, e suas funções biológicas (BRIEST *et al.*, 2014).

Alguns resultados obtidos em nosso laboratório indicaram que um dos alvos da P21-His₆ seria o receptor da quimiocina CXCL-12, o CXCR4 (RODRIGUES *et al.*, 2012). Pela técnica de *Biopanning* (Figura 6, 7 e 8), nossos resultados corroboram os dados anteriores, de forma que a análise *in silico* (Figura 7) nos mostrou alta semelhança entre os bacteriófagos selecionados (A11, em especial) para a proteína P21-His₆, sugerindo que estes mimetizariam regiões do receptor CXCR4. Dessa forma, hipotetizamos se esses bacteriófagos não teriam capacidade de reduzir o efeito pró-fagocítico da P21-His₆ por bloquearem, ao menos parcialmente, a interação da P21-His₆ com a célula do hospedeiro (Figura 8). Observamos que os fagos A11 e B2, dois dos mais reativos, possuíam capacidade de reduzir a invasão natural de formas tripomastigotas de *T. cruzi* e também de anular o efeito pró-fagocítico do tratamento com P21-His₆.

O desenvolvimento de ferramentas anti-infectivas usando bacteriófagos é recorrente na literatura e para todos tipos de agentes biológicos (bactérias, vírus, parasitas) (HUANG *et al.*, 2012). Já foi observado o uso de bacteriófagos selecionados por *phage display* para neutralizar os efeitos da toxina Shiga produzida por *Escherichia coli* (BERNEDO-NAVARRO *et al.*, 2014) e para neutralizar a enzima urease de *Helicobacter pylori* (HOUIMEL *et al.*, 1999). Também se estuda o nanoencapsulamento de drogas para o tratamento de câncer utilizando-se de bacteriófagos e seus peptídeos específicos (PETRENKO e JAYANNA, 2014). Sabendo que a ligação do bacteriófago com a P21-His₆, se dá pela cauda de peptídeos do mesmo e que a P21-His₆ teve seu efeito biológico inibido pelos peptídeos específicos dos

bacteriófagos selecionados, hipotetizamos que esses peptídeos podem ter algum valor terapêutico no controle da invasão de *T. cruzi*.

5.4. Atividades Biológicas da Proteína P21-His₆ e seu Potencial Terapêutico.

Conhecendo que a atividade pro-fagocítica da P21-His₆ é reduzida durante o tratamento com o inibidor de CXCR4 (ROODRIGUES *et al.*, 2012), e sabendo da importância desse receptor para processos de quimiotaxia (MURDOCH *et al.*) resolvemos aprofundar nossos estudos nos efeitos biológicos da proteína P21-His₆ nesse processo. Para tanto, realizamos ensaios de recrutamento celular (Figura 9) onde observamos que a proteína P21-His₆ aumenta o recrutamento de células hematopoiéticas para a cavidade peritoneal de camundongos Balb/c (9A), sugerindo um efeito quimiotático para a proteína recombinante, possivelmente por interagir com o receptor CXCR4 e ativá-lo. Paralelamente observamos que o perfil de células recrutado muda proporcional de polimorfonucleares para macrófagos e linfócitos, sugerindo um perfil de recrutamento semelhante ao que ocorre durante processos infecciosos onde os neutrófilos que a primeira linha de defesa do organismo, liberando fatores quimiotáticos e proteases que alteram o microambiente e estimulam a migração de outras células de defesa (CASSATELA, 1995), vão tendo sua população mudada para macrófagos e linfócitos para uma resposta mais específica (TREPAT *et al.*, 2012).

Sabendo da importância da quimiotaxia e do recrutamento celular nos processos inflamatórios, resolvemos estudar o papel da P21-His₆ nos processos de inflamação de corpo estranho. A inflamação é uma reação complexa que ocorre a nível tecidual frente a algum estímulo lesivo e com função de subverter o agente lesivo e restaurar o tecido lesado (COTRAN *et al.*, 2000). O modelo empregado neste estudo para avaliar a atividade biológica da forma recombinante da P21 em processos inflamatórios foi proposto por Grindlay *et al.*, em 1951 e consiste na implantação de matrizes esponjosas no tecido subcutâneo de mamíferos, induzindo a migração celular, a formação tecidual e vascularização. Dessa forma observamos diferentes doses de P21-His₆ num momento de inflamação crônica (9 dias após o implante das esponjas) (Figura 10). Concluímos que a proteína recombinante tem um efeito relativamente pequeno na indução de reparo celular (10A), processo que se inicia junto com a inflamação e somente termina ao fim do processo lesivo (WILLENBORG *et al.*, 2014). Contudo, ela apresentou efeito anti-

angiogênico, ao diminuir os níveis de hemoglobina (10B) e a quantidade de vasos sanguíneos (10C).

Terapeuticamente se busca a descoberta de novos tratamentos para eventos angiogênicos, como são os casos de muitos tumores (JOHANNESSEN *et al.*, 2013). Já sabemos que parasitas e tumores trocam antígenos (DARANI e YOUSEFI, 2012), e que outra proteína de *T. cruzi*, calreticulina, também tem atividade anti-angiogenica e antitumoral (LOPEZ *et al.*, 2010 e MOLINA *et al.*, 2005). Dessa forma sugerimos que a P21-His₆ possa ter função terapêutica no controle de tumores devido a sua atividade anti-angiogênica.

Outra característica marcante do processo inflamatório é a presença de neutrófilos e macrófagos no sítio inflamatório. Assim, corroboramos nossos dados de quimiotaxia com cortes histológicos, mostrando um visível infiltrado celular maior em esponjas tratadas com P21-His₆, quando comparadas com esponjas tratadas com salina. O acúmulo de neutrófilos pode ser detectado de forma indireta pela dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase, um marcador quantitativo de neutrófilos (BRADLEY *et al.*, 1982) e o acúmulo de macrófagos pode ser detectado com a enzima NAG de macrófagos ativados. Assim, observamos que a dose de 100µg/20µL de P21-His₆ gerou um aumento da atividade das enzimas MPO e que qualquer dose de P21-His₆ gerou um aumento relativo da atividade de NAG sugerindo uma maior ativação de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, ou um maior recrutamento dos mesmos para a matriz esponjosa contendo P21-His₆.

Dessa forma, acreditamos que a proteína P21-His₆ exerça uma relevante importância para o estabelecimento da infecção por *T. cruzi* e que sendo assim acreditamos que ela poderia se tornar um potencial alvo terapêutico tanto para o controle da infecção, como por outros efeitos biológicos, como o revelado efeito anti-angiogênico, útil na terapêutica de tumores em crescimento.

6. Conclusões

Com nossos resultados podemos concluir que:

- A proteína galectina-3 participa do tráfego intracelular de *T. cruzi* e produz estruturas polarizadas de galectina-3 que vão sumindo ao longo do tempo.
- A baixa expressão de AFAP-1L1 e WASP parecem aumentar a multiplicação intracelular, sugerindo que um desarranjo na regulação do citoesqueleto de actina afrouxe a célula e favoreça o parasita.
- A interação da P21-His₆, com seu receptor de membrana CXCR4, pode ser competidos com os bacteriófagos específicos, reduzindo-se os efeitos biológicos da mesma.
- A proteína P21- His₆ apresentou atividade anti-angiogênica.
- A proteína P21-His₆ produz quimiotaxia celular de neutrófilos e macrófagos ativados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. "Chapter 16: The cytoskeleton". **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science. (2002). 907–982.

ALCANTARA A, BRENER Z. *Trypanosoma cruzi*: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. **Experimental Parasitology**. (1980). 50:1-6.

ANDRADE LO, ANDREWS NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **The Journal of Experimental Medicine**. (2004). 200:1135-43.

ANDRADE SP, FAN TPD, LEWIS GP. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **British Journal of Experimental Pathology**. (1987). 68:755-766.

ANDREWS NW, ABRAMS CK, SLATIN SL, GRIFFITHS GA. *T. cruzi* secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**. (1990). 61:1277-1287.

ANDREWS NW, KATZIN AM, COLLI W. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. **European Journal of Immunology**. (1984). 140:599-604.

ANDREWS NW, WHITLOW MB. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**. (1989). 33:249-256.

BAILEY PJ. Sponge implants as models. **Methods in Enzymology**. (1988). 162:327-334.

BARBONI E, COADE S, FIORI A. The binding of mycolic acids to galectin-3: a novel interaction between a host soluble lectin and trafficking mycobacterial lipids?. **The Federation of European Biochemical Societies Letters**. (2005). 579:6749-55.

BARRETO MP. **Epidemiologia**. In: BRENER Z, ANDRADE Z. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chaga, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. (1979). 89-151.

BILATE AM, CUNHA-NETO E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. (2008). 50:67-74.

BEACHEY EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. **The Journal of Infectious Diseases**. (1981). 143:325-345.

BERNEDO-NAVARRO RA, MIYACHIRO MM, DA SILVA MJ, REIS CF, CONCEIÇÃO RA, GATTI MS, YANO T. Peptides derived from phage display libraries as potential neutralizers of Shiga toxin-induced cytotoxicity in vitro and in vivo. **Journal of Applied Microbiology**. (2014). doi: 10.1111/jam.12451.

BRADFORD M. **Analytical Biochemistry**. (1976). 72:248-254.

BRENER Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**. (1973). 27:347-382.

CASSATELA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**. (1995). 16:21-6.

CASTELLANO F, CHAVRIER P, CARON E. Actin dynamics during phagocytosis. **Seminars in immunology**. (2001). 13:347-355.

COLLI W. Interiorization of *Trypanosoma cruzi* into mammalian host cells in the light of the parasite membrane chemical composition. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. (1984). 79:45-50.

COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Robbins - Patología estrutural e funcional. 6ª edição. Ed. Guanabara Koogan. (2000).

COURA JR, JUNQUEIRA ACV, FERNANDES O, VALENTE SAS, MILES MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitology**. (2002). 18:171-176.

CVEJIC A, HALL C, BAK-MAIER M, FLORES MV, CROSIER P, REDD MJ, MARTIN P. Analysis of WASp function during the wound inflammatory response--live-imaging studies in zebrafish larvae. **Journal of Cell Science**. (2008). 19:3196-206.

DARANI HY, YOUSEFI M. Parasites and cancers: parasite antigens as possible targets for câncer immunotherapy. **Future Oncology**. (2012). 12:1529-35.

DC-RUBIN SS, SCHENKMAN S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cellular Microbiology**. (2012). 14:1522-30.

DE SOUZA W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cell and Molecular Biology**. (1984). 86:197-283.

DIAS JCP. **Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine**. In: WENDEL S, BRENER Z, CAMARGO ME, RASSI A. Eds.) ISBT, Sao Paulo. (1992). 49-80.

DOMINGUEZ R. Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. (2009). 44:351-66.

ESCUADERO-ESPARZA A, JIANG WG, MARTIN TA. Claudin-5 is involved in breast cancer cell motility through the N-WASP and ROCK signalling pathways. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. (2012) 31:43.

FENG S, CHEN JK, YU H, SIMON JA, SCHREIBER SL. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. **Science**. (1994). 266:1241-1247.

FERNANDES MC, FLANNERY AR, ANDREWS N, MORTARA RA. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. **Cellular Microbiology**. (2013). 15:977-91

FERNANDES MC, CORTEZ M, FLANNERY AR, TAM C, MORTARA RA, ANDREWS NW. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**. (2011). 208:909-21.

FERNANDES PCC. Expressão gênica dos alelos da proteína P21 na infectividade de cepas pertencentes a diferentes linhagens filogenéticas de *Trypanosoma cruzi*. **Dissertação (Mestrado)**. - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. (2013). 49f.

FURU M, KAJITA Y, NAGAYAMA S, ISHIBE T, SHIMA Y, NISHIJO K, UEJIMA D, TAKAHASHI R, AOYAMA T, NAKAYAMA T, NAKAMURA T, NAKASHIMA Y, IKEGAWA M, IMOTO S, KATAGIRI T, NAKAMURA Y, TOGUCHIDA J. Identification of AFAP1L1 as a prognostic marker for spindle cell sarcomas. **Oncogenesis**. (2011). 38:4015-25.

GIBSON TJ, HYVONEN M, MUSACCHIO A, SARASTE M, BIRNEY E. PH domain: the first anniversary. **Trends in Biochemical Sciences**. (1994). 19:349-353.

GIORDANO R, CHAMMAS R, VEIGA SS, COLLI W, ALVES MJM. An-acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Molecular and Biochemical Parasitology**. (1994). 65:85–94.

GIORDANO R, FOUTS DL, TEWARI D, COLLI W, MANNING JE, ALVES MJM. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. **Journal of Biological Chemistry**. (1999). 274:3461-3468.

GRELLIER P, VENDEVILLE S, JOYEAU R, BASTOS IMD, DROBECQ H, FRAPPIER F, TEIXEIRA ARL, SCHREVEL J, DAVIOUD-CHARVET E, SERGHERAERT C, SANTANA JM. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **Journal of Biological Chemistry**. (2001). 276:47078-47086.

GRINDLAY JH, WAUGH JM. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. **American Medical Association Archives of Surgery**. (1951). 63:288-97.

GUAPPONE AC, FLYNN DC. The integrity of the SH3 binding motif of AFAP-110 is required to facilitate tyrosine phosphorylation by, and stable complex formation with, Src. **Molecular and Cellular Biology**. (1997). 175:243-252.

GUAPPONE AC, WEIMER T, FLYNN DC. Formation of a stable src-AFAP-110 complex through either an amino-terminal or a carboxy-terminal SH2-binding motif. **Molecular Carcinogenesis**. (1998). 22:110-119.

HALL BF. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of entry into host cells. **Seminars in Cell Biology**. (1993). 4:323-333.

HOUIMEL M, MACH JP, CORTHÉSY-THEULAZ I, CORTHÉSY B, FISCH I. New inhibitors of *Helicobacter pylori* urease holoenzyme selected from phage-displayed peptide libraries. **European Journal of Biochemistry**. (1999). 262:774-80.

HSU DK, CHERNYAVSKY AI, CHEN HY, YU L, GRANDO SA, LIU FT. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. **Journal of Investigative Dermatology**. (2009). 129:573–583.

HU DE, HILEY CR, SMITHER RL, GRESHAM GA, FAN TPD. Correlation of ^{133}Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. **Laboratory Investigation**. (1995). 72:601.

HUANG JX, BISHOP-HURLEY SL, COOPER MA. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. (2012). 59:4569-82.

IRETON K. Molecular mechanisms of cell-cell spread of intracellular bacterial pathogens. **Open Biology**. (2013). 7:130079

JOHANNESSEN TC, WAGNER M, STRAUME O, BJERKVIG R, EIKESDAL HP. Tumor vasculature: the Achilles' heel of cancer? **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. (2013). 17:7-20.

JUNQUEIRA C, CAETANO B, BARTHOLOMEU DC, MELO MB, ROBERT C, RODRIGUES MM, GAZZINELLI RT. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**. (2010). 12:e29.

KLESHCHENKO YY, MOODY TN, FURTAK VA, OCHIENG J, LIMA MF, VILLALTA F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human artery smooth muscle cells. **Infection and Immunity**. (2004). 72:6717-6721.

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

LEMMON MA, FERGUSON KM, O'BRIEN R, SIGLER PB, SCHLESSINGER J. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. (1995). 92:10472-10476.

LEY V, ROBBINS ES, NUSSENZWEIG V, ANDREWS NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **The Journal of Experimental Medicine**. (1990). 171:401-413.

LINDEN JR, KUNKEL D, LAFORCE-NESBITT SS, BLISS JM. The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. **Cellular Microbiology**. (2013). 15:1127-43.

LÓPEZ NC, VALCK C, RAMÍREZ M, RIBEIRO C, ORELLANA J, MALDONADO I, ALBINI A, ANACONA D, LEMUS D, AGUILAR L, SCHWABLE W, FERREIRA

A. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* calreticulin. **Plos Neglected Tropical Diseases**. (2010). 7:e730.

MACHADO FC, CRUZ L, SILVA AA, CRUZ MC, MORTARA RA, ROQUE-BARREIRA MC, SILVA CV. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology**. (2013). 24:179-84.

MACHESKY LM, INSALL RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. **Current Biology**. (1998). 25:1347-56.

MARTINS, FA. Estudos biológicos da P21 de *Trypanosoma cruzi* e seu efeito na multiplicação parasitária. **Monografia (Graduação)**. Instituto de Biologia – Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado. (2013). 52f.

MCCORMACK J, WELSH NJ, BRAGA VM. Cycling around cell-cell adhesion with Rho GTPase regulators. **Journal of Cell Science**. (2013) 15:379-91.

MOLINA MC1, FERREIRA V, VALCK C, AGUILAR L, ORELLANA J, ROJAS A, RAMIREZ G, BILLETTE R, SCHWAEBLE W, LEMUS D, Ferreira A. An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**. (2005). 140:133-40.

MOODY TN, OCHIENG J, VILLALTA F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Letters**. (2000). 470:305-308.

MORTARA RA, ANDREOLI WK, TANIWAKI NN, FERNANDES AB, SILVA CV, FERNANDES MC, L'ABBATE C, SILVA SD. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. (2005). 77:77-94.

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

MOTT A, LENORMAND G, COSTALES J, FREDBERG JJ, BURLEIGH BA. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cellular Physiology**. (2009). 218:315–322.

MURDOCH C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. **Immunological Reviews**. (2000). 177:175-84.

NOGUEIRA N, COHN Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and Intracellular fate in mammalian cells. **The Journal of Experimental Medicine**. (1976). 143:1402-1420.

NOGUEIRA NFS, GONZALEZ MS, GOMES JE, DE SOUZA W, GARCIA ES, AZAMBUJA P, NOHORA LL, ALMEIDA IC, ZINGALES C, COLLI W. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**. (2007). 116:120–128.

ONG CC1, JUBB AM, ZHOU W, HAVERTY PM, HARRIS AL, BELVIN M, Friedman LS, KOEPPEH H, HOEFLICH KP. p21-activated kinase 1: PAK'ed with potential. **Oncotarget**. (2011). 2:491-6.

PAUL AS, POLLARD TD. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. **Cell Motility and the Cytoskeleton**. (2009). 66:606-17.

PAWSON T, SCOTT JD. Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. **Science**. (1997). 278:2075-2080.

PAZ I, SACHSE M, DUPONT N, MOUNIER J, CEDERFUR C, ENNINGA J, LEFFLER H, POIRIER F, PREVOST MC, LAFONT F, SANSONETTI P. Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. **Cellular Microbiology**. (2010). 12:530–544.

PEREIRA PCM, NAVARRO EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. (2013):19: 34.

PETRENKO VA, JAYANNA PK. Phage protein-targeted cancer nanomedicines. **The Federation of European Biochemical Societies Letters**. (2014). 588:341-9.

PLUNKETT ML e HAILEY JA. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Laboratory Investigation**. (1990). 62:510-517.

PROCÓPIO DO, BARROS HC, MORTARA RA. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal os Cell Biology**. (1999). 78:911-924.

PROCÓPIO DO, SILVA S, CUNNINGHAM CC, MORTARA RA. *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**. (1998) 90:1-13.

QIAN Y, GATESMAN AS, BAISDEN JM, ZOT HG, CHEREZOVA L, QAZI I, MAZLOUM N, LEE MY, GUAPPONE-KOAY A, FLYNN DC. Analysis of the role of the leucine zipper motif in regulating the ability of AFAP-110 to alter actin filament integrity. **Journal of Cellular Biochemistry**. (2004). 91:602-620.

QIAN Y, BAISDEN JM, ZOT HG, VAN WINKLE WB, FLYNN DC. The carboxy terminus of AFAP-110 modulates direct interactions with actin filaments and regulates its ability to alter actin filament integrity and induce lamellipodia formation. **Experimental Cell Research**. (2000). 255:102-113.

QUAISSI MA, 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**. (1986). 19:201-211.

QUATTRONI P, LI Y, LUCCHESI D, LUCAS S, HOOD DW, HERMANN M, GABIUS HJ, TANG CM, EXLEY RM. Galectin-3 binds *Neisseria meningitidis* and increases interaction with phagocytic cells. **Cellular Microbiology**. (2012). 14:1657-75.

RASSI A, RASSI Jr. A. **Doença de Chagas**. In: AMATO NETO V, GRYSCHKE RCB, AMATO VS, TUON FF. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Elsevier, Rio de Janeiro. (2008). 127-138.

RIBEIRO AL, NUNES MP, TEIXEIRA MM, ROCHA MO. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**. (2012). 10:576–589.

RODRIGUES, A.A. Estudo da suscetibilidade de amastigotas extracelulares das cepas G e CL de *Trypanosoma cruzi* a componentes do sistema imune inato e adaptativo. Avaliação da atividade pró-fagocítica da P21-His₆. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e Imunologia Aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. (2011). 113f.

RODRIGUES AA, CLEMENTE TM, SANTOS MA, MACHADO FC, GOMES RGB, MOREIRA HHT, CRUZ MC, BRIGIDO PC, DOS SANTOS PCF, MARTINS FA, BAHIA D, MARICATO JT, JANINI LMR, REBOREDO EH, MORTARA RA, SILVA

CV.A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **Plos One**. (2012). 7:e51384

ROHATGI R, MA L, MIKI H, LOPEZ M, KIRCHHAUSEN T, TAKENAWA T, KIRSCHNER MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. **Cell**. (1999). 97(2):221–31.

SANTANA JM, GRELLIER P, SCHREVEL J, TEIXEIRA ARA. *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochemical Journal**. (1997). 325:129-137.

SANTOS MA, TEIXEIRA FB, MOREIRA HHT, RODRIGUES AA, MACHADO FC, CLEMENTE TM, BRIGIDO PC, TAVARES E SILVA R, PURCINO C, GOMES, RGB, BAHIA D, MORTARA RA, MUNTE CE, HORJALES E, SILVA CV. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**. (2014). 4:4259

SCHENKMAN S, DIAZ C, NUSSENZWEIG V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Experimental Parasitology**. (1991) 72:76-86.

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

SHAW, G. The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. **BioEssays**. (1996). 18:35-46.

SILVA CV, KAWASHITA SY, PROBST CM, DALLAGIOVANNA B, CRUZ MC, SILVA EA, SOUTO-PADRÓN TCBS, KRIEGER MA, GOLDENBERG S, BRIONES MRS, ANDREWS NW, MORTARA RA. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**. (2009). 11:563-570.

SNYDER BN, CHO Y, QIAN Y, COAD JE, FLYNN DC, CUNNICK JM. AFAP1L1 is a novel adaptor protein of the AFAP family that interacts with cortactin and localizes to invadosomes. **European Journal of Cell Biology**. (2011). 90: 376–389

TAM C, IDONE V, DEVLIN C, FERNANDES MC, FLANNERY A, HE X, SCHUCHMAN E, TABAS I, ANDREWS NM. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **The Journal of Cell Biology**. (2010). 189:1027-38.

TARDIEUX I, WEBSTER P, RAVESLOOT J, BORON W, LUNN JA, HEUSER JE, ANDREWS NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**. (1992) 71:1117-1130.

TARDIEUX I, NATHANSON MH, ANDREWS NW. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca_2^+ transients. **The Journal of Experimental Medicine**. (1994) 179:1017-1022.

VIANNA G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas”. Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. (1911). 3:276-293.

TREPAT X, CHEN Z, JACOBSON K. Cell migration. **Comprehensive Physiology**. (2012). 4:2369-92.

TYLER KM, LUXTON GWG, APPLEWHITE DA, MURPHY SC, ENGMAN DM. Responsive microtubule dynamics promote cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**. (2005) 7:1579-1591.

WILLENBORG S, EMING SA. Macrophages - sensors and effectors coordinating skin damage and repair. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. (2014). 3:214-21.

WOOLSEY AM. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. **Cellular Microbiology**. (2004) 6:829-838.

XIE C, LI N, CHEN ZJ, LI BL, SONG BL. The small GTPase Cdc42 interacts with Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and controls its movement from endocytic recycling compartment to plasma membrane in a cholesterol-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**. (2011). 41:35933-42.

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

ZHANG J, ZHANG X, GUO Y, XU L, PEI D. Sorting nexin 33 induces mammalian cell micronucleated phenotype and actin polymerization by interacting with Wiskott-Aldrich syndrome protein. **The Journal of Biological Chemistry**. (2009). 284:21649-69.

ZIGMOND SH. Actin cytoskeleton: the Arp2/3 complex gets to the point. **Current Biology**.i (1998). 18:R654-7

ZINGALES B, KATZIN AM, ARRUDA MV, COLLI W. Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cell. **Molecular and Biochemical Parasitology**. (1985). 16: 21-34.