

ANNY CAROLLINE SILVA OLIVEIRA

**Caracterização biológica de tripomastigotas de *T. cruzi*
provenientes de células deficientes em LAMP**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
JULHO/2017

ANNY CAROLLINE SILVA OLIVEIRA

**Caracterização biológica de tripomastigotas de *T. cruzi*
provenientes de células deficientes em LAMP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Coorientadora: Dra. Érika Cristina Jorge

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

JULHO/2017

AGRADECIMENTOS CIENTÍFICOS

Agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG por oferecerem condições para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

À minha orientadora por toda paciência e dedicação dados a mim e a este trabalho. Por sua orientação, ensinamentos, palavras de incentivo, pelo suporte nos momentos complicados, muito obrigada Professora Luciana Andrade.

À minha coorientadora, Professora Érika Jorge por sua dedicação e carinho. Obrigada por me socorrer nos momentos de dificuldade, por sanar as minhas dúvidas, pelos auxílios na realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Professor Gregory Kitten, por fazer parte do Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Seus auxílios e dicas foram fundamentais.

Ao Professor Gustavo Menezes por permitir que eu utilizasse os equipamentos de aquisição de imagens para realização de parte deste trabalho.

À Pós-Graduação em Biologia Celular por seus serviços prestados.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me abençoar todos os dias da minha vida. Por ter me dado forças para perseverar até o fim e para transpor todas as pedras no caminho. Sem Ele, não seria possível.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo carinho, amor e dedicação. Por acreditarem e investirem em mim, por todo o apoio nos últimos meses. Muito obrigada!

À Natália Couto e à Patrícia Dias por todo apoio, carinho, amizade, conselhos, ombro amigo para chorar... Obrigada por tudo, meninas! Vocês fizeram toda diferença ao longo da minha jornada!

À Luisa Rezende, à Rhyanne Capila e ao Victor Coutinho por me alegrarem nos meus dias difíceis, por discutirem e me auxiliarem nos experimentos. Obrigada pela amizade de vocês.

A todo o LBCM, pelo apoio e carinho. Vocês estarão eternamente no meu coração.

Aos amigos do LABODE, Rayan Silva e Júlia Meirelles, por todo apoio, risadas, auxílios, conselhos, carinho, todos os socorros nos experimentos. Muito obrigada!

A todos os amigos que contribuíram para a execução deste trabalho de forma direta ou indireta.

E a todos os amigos do LIGP que fizeram parte do início desta jornada me auxiliando e incentivando durante a seleção do mestrado.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença tropical negligenciada, de grande importância epidemiológica. O *T. cruzi* entra nas células hospedeiras interagindo com sua superfície e causando lesões em sua membrana, as quais levam a um processo de endocitose compensatória que culmina na internalização do parasito. Em estudos anteriores mostramos que a ausência de duas proteínas localizadas na membrana lisossomal, LAMP-1 e 2, interferem com a entrada do *T. cruzi* e com sua multiplicação no interior das células hospedeiras. No interior de células deficientes em LAMP, os parasitos apresentam uma capacidade de multiplicação muito maior do que em células selvagens. Poderia um ambiente intracelular deficiente em LAMP alterar características do parasito? Para responder esta questão, infectamos fibroblastos selvagens e deficientes em LAMP-1 e/ou LAMP-2 e avaliamos, nesses parasitos, as taxas de invasão e adesão celular em células selvagens para LAMP e em células da linhagem LLC-MK2, bem como a capacidade de injuriar as células. Nossos resultados mostraram que, para as culturas de fibroblastos selvagens, os parasitos derivados de células deficientes em LAMP-1 e LAMP-2 ou apenas em LAMP-2 apresentam uma taxa de invasão diferente entre si e também quando comparados aos parasitos derivados de células selvagens para LAMP. Demonstramos que estas diferenças não estão relacionadas à capacidade de adesão dos parasitos à célula hospedeira, o que foi corroborado por ensaios realizados em uma linhagem de células epiteliais, LLC-MK2. Por outro lado, as diferenças nas taxas de invasão mostraram ser influenciadas pela capacidade de injúrias e sinais de cálcio intracelular induzidos por estes parasitos. Nós acreditamos que o ambiente intracelular deficiente em LAMP esteja alterando a expressão de proteínas de superfície do parasito, acarretando no seu maior ou menor sucesso de invasão celular. Essa hipótese é corroborada por ensaios preliminares da análise de microvesículas liberadas pelos parasitos provenientes dos três tipos celulares.

Palavras-chave: LAMP, *Trypanosoma cruzi*, infectividade

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas' disease, a neglected tropical disease of great epidemiological importance. *T. cruzi* enters the host cells interacting with its surface and causing lesions on its membrane. The latter leads to a process of compensatory endocytosis that culminates with the internalization of this parasite. In previous studies, we have shown that the absence of two lysosomal membrane proteins, LAMP-1 and 2 interferes with the entry of *T. cruzi* and their growth within the host cells. Inside LAMP-deficient cells, parasite intracellular multiplication rates are much higher than that observed in wild-type cells. In order to investigate whether LAMP-deficient intracellular environment would alter parasite's characteristics, we infected wild-type and LAMP-1 and/or LAMP-2 deficient fibroblasts and evaluated the rates of invasion and cell adhesion in wild-type LAMP and LLC-MK2 cells, as well as their ability to injure cells. Our results showed that, for wild-type fibroblast cultures, parasites derived from LAMP-1 and 2 or only from LAMP-2 deficient cells differ in their invasion rate, as well as when compared to wild-type derived parasites. We also demonstrated that these differences were not related to the ability of these parasites to adhere to the host cell, which was corroborated by assays performed on an epithelial cell line, LLC-MK2. On the other hand, differences in invasion rates were influenced by the ability of these parasites to cause cellular lesions and induce calcium signals. We believe that the LAMP deficient intracellular environment is able to modify the expression of surface proteins of the parasite, affecting positively or negatively their success in cellular invasion. This hypothesis is corroborated by preliminary studies of the analysis of microvesicles released by the parasites derived from the three cell types studied.

Key-words: LAMP, *Trypanosoma cruzi*, infectivity

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+TIPs	– <i>microtubule plus-end tracking protein</i>
BSA	– <i>Bovine Serum Albumine</i>
B2R	– <i>Bradicin-2 Receptor</i>
cAMP	– Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico
Cav-1	– Caveolina-1
CHO	– <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CLASP	– <i>Cytoplasmic Linker Associated Protein</i>
CM-H ₂ DCFDA	– <i>5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester</i>
CRISPR-Cas9	– <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Caspase 9</i>
CRP	– <i>Complement Regulatory Protein</i>
Ca ²⁺	– Íons cálcio
DAPI	– <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	– <i>Dulbecco Modified Eagles' Medium</i>
DNA	– <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	– <i>Deoxynucleotide</i>
DTU	– <i>Discrete Typing Units</i>
EB	– <i>End-binding</i>
EDTA	– <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic acid</i>
ERK	– <i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
GFP	– <i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	– <i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
HBSS	– <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
IgG	– <i>Imunoglobulina G</i>
IP3	– <i>Fosfatidilinositol 3,4,5-3-fosfato</i>
kDa	– <i>kiloDalton</i>
KOL1	– <i>Knock out para LAMP1</i>
KOL1/L2	– <i>Knock out para LAMP1 e 2</i>
KOL2	– <i>Knock out para LAMP2</i>
LAMP	– <i>Lysosome Associated Membrane Proteins</i>
LAMP-1	– <i>Lysosome Associated Membrane Protein-1</i>

LAMP-2	– <i>Lysosome Associated Membrane Protein-2</i>
LC-MS/MS	– <i>Liquid chromatography tandem-mass spectrometry</i>
LLC-MK2	– <i>Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells</i>
MAP	– <i>Mitogen Activated Protein</i>
MASP	– <i>Mucin-Associated Surface Protein</i>
MEF	– <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>
miRNAs	– micro RNAs de interferência
MOI	– <i>Multiplicity Of Infection</i>
mRNAs	– micro RNAs
NTA	– <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
OPB	– Oligopeptidase B
pb	– Pares de Base
PBS	– <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS ^{+/+}	– <i>Phosphate Buffered Saline</i> com íons cálcio e magnésio
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	– Paraformaldeído
pH	– Potencial hidrogeniônico
PI-3/Akt	– <i>Phosphatidylinositol-3/V-akt murine thymoma viral oncogene</i>
PPD	– p-Fenilenodiamina
RNA	– <i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	– <i>Reactive Oxygen Species</i>
SAP	– <i>Serine-, Alanine-, and Proline-rich protein</i>
TAE	– Tampão Tris-Acetato-EDTA
Tc-TOX	– <i>T. cruzi hemolysin</i> (putativa)
TESA	– <i>Trypanosoma cruzi Excreted-Secreted Antigens</i>
TS	– super família gp85/ <i>trans</i> -sialidase
TSSA	– <i>Trypomastigote Small Surface Antigen</i>
TS/SAPA	– <i>Trans-sialidase/Shed Acute-Phase Antigen</i>
WT	– <i>Wild Type</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 2: Fases clínicas da doença de Chagas.....	16
Figura 3: Modelo esquemático da superfície de uma célula e uma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> hipotéticas resumindo as moléculas envolvidas na interação parasito-célula hospedeira.....	19
Figura 4: Esquema da estrutura das proteínas LAMP-1 e LAMP-2 e sua localização no lisossomo.....	23
Figura 5: Mecanismo de ação de proteínas secretadas em vesículas.....	25
Figura 6: Ensaio de Invasão com parasitos provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em células WT.....	40
Figura 7: Ensaio de Invasão com parasitos provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em células LLC-MK2.....	40
Figura 8: Ensaio de adesão em fibroblastos WT.....	42
Figura 9: Ensaio de adesão em células LLC-MK2.....	42
Figura 10: Perfil de microvesículas de tripomastigotas derivadas de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2.....	44
Figura 11: Perfil de indução de sinal de cálcio em fibroblastos WT e células LLC-MK2 induzidas por tripomastigotas derivadas de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2.....	47
Figura 12: Ensaio de microinjúria em fibroblastos WT (A) e células epiteliais LLCMK2 (B).....	49
Figura 13: Ensaio de microinjúria em fibroblastos WT (A) e células epiteliais LLC-MK2 (B).....	50
Figura 14: Ensaio de estresse oxidativo em fibroblastos infectados e não infectados.....	52
Figura 15: Eletroforese dos clones obtidos, em bactérias, do plasmídeo contendo CLASP1 α	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	O <i>Trypanosoma cruzi</i> e seu ciclo de vida.....	13
1.2	A doença de Chagas, seus aspectos clínicos e epidemiológicos	15
1.3	A interação parasito-célula hospedeira e o ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>	16
1.4	O papel das LAMPs na infecção celular pelo <i>T. cruzi</i>	21
1.5	As microvesículas do <i>T. cruzi</i> e seu papel na infecção celular	24
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
3.1.	Objetivo geral.....	29
3.2.	Objetivos específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1.	Cultivo de células da linhagem LLC-MK2.....	30
4.2.	Cultivo de fibroblastos murinos	30
4.3.	Cultivo de formas tripomastigotas	31
4.4.	Monitoramento das culturas para contaminação com <i>Mycoplasma</i> sp.....	31
4.5.	Tipagem dos fibroblastos para fenótipo deficiente para LAMP	32
4.6.	Ensaio de invasão celular do <i>T. cruzi</i>	32
4.7.	Ensaio de adesão celular do <i>T. cruzi</i>	33
4.8.	Ensaio de estresse oxidativo	34
4.9.	Ensaio de injúria celular causada por parasitos derivados de fibroblastos selvagens e deficientes para LAMP e de células LLC-MK2.....	34
4.10.	Obtenção de fibroblastos <i>knock outs</i> para Clasp -1 α por meio do sistema CRISPR-Cas9	35
4.11.	Microvesículas de tripomastigotas liberadas de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2	37
4.12.	Ensaio de sinalização de cálcio em fibroblastos WT e células LLC-MK2 com parasitos derivados de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2	38
5	RESULTADOS	39
5.1.	Análise da taxa de invasão de tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2	39
5.2.	Análise da taxa de adesão de tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2	41
5.3.	Análise de microvesículas de tripomastigotas derivadas de células WT, KOL1/L2 e KOL2	43

5.4. Análise de sinalização de cálcio induzida por tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 e de células LLC-MK2	45
5.5. Análise da injúria celular causada por tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 e de células LLC-MK2	48
5.6. Análise do estresse oxidativo induzido pela infecção com <i>T. cruzi</i> em fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2.....	51
5.7. Avaliação do recrutamento de +TIPs para o local de invasão do parasito e obtenção de células <i>knock outs</i> para essas proteínas a partir de CRISPR-Cas9	53
6 DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomíase americana, popularmente conhecida como doença de Chagas, foi descoberta em 1909 pelo médico Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (CHAGAS, 1909). Carlos Chagas não só descreveu a doença, mas também seu agente etiológico, o protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* (nomeado em homenagem ao seu amigo, Dr. Oswaldo Cruz), bem como identificou seu vetor de transmissão, um inseto hematófago conhecido como barbeiro (CHAGAS, 1909).

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo de vida

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) é um protozoário parasito que apresenta dois hospedeiros em seu ciclo de vida, um inseto vetor da subfamília Triatominae e um vertebrado mamífero (CHAGAS, 1909; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Atualmente, são reconhecidos dois ciclos de transmissão do *T. cruzi*: um ciclo silvestre e um doméstico. No ciclo silvestre, ciclo original da doença, participam mais de duzentas espécies entre hospedeiros mamíferos e triatomíneos silvestres, porém o ciclo do parasito nestes animais ainda é pouco conhecido (ARGOLO et al., 2008). No ciclo doméstico, o mais estudado, participam o homem, animais sinantrópicos e triatomíneos domiciliares (ARGOLO et al., 2008). Por ser o ciclo de transmissão mais esclarecido, as informações aqui descritas sobre o ciclo do *T. cruzi* referem-se ao ciclo doméstico.

Em seu ciclo de vida (Figura 1), o *T. cruzi* se apresenta sob quatro formas distintas sendo elas: epimastigota, tripomastigota metacíclica, amastigota e tripomastigota sanguínea. A forma epimastigota, flagelada, é replicativa e encontrada no intestino de triatomíneos. As formas epimastigotas provém de formas tripomastigotas sanguíneas ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado com o parasito. Na ampola retal do inseto vetor, as epimastigotas se diferenciam novamente em formas tripomastigotas, denominadas agora tripomastigotas metacíclicas, que são formas flageladas e infectivas para o hospedeiro vertebrado. As tripomastigotas metacíclicas são expelidas juntamente com as fezes e urina pelo hospedeiro invertebrado, durante o repasto sanguíneo, e ganham acesso ao hospedeiro vertebrado através de microlesões em sua pele ou

através das mucosas. Uma vez no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas possuem a habilidade de infectar uma grande variedade de células nucleadas de seu hospedeiro vertebrado, onde se diferenciam na forma replicativa com flagelo não proeminente, conhecida como amastigota. Esta última se multiplica ocupando todo o citoplasma da célula hospedeira até que se diferencia novamente na forma tripomastigota, neste caso denominada de tripomastigota sanguínea. As tripomastigotas liberadas pelas células hospedeiras ganham a corrente sanguínea e podem novamente invadir outras células nucleadas bem como também serem ingeridas por um novo inseto vetor, completando assim o ciclo de vida do parasito (BRENER, 1973). Os múltiplos ciclos de infecção das células nucleadas do hospedeiro pelo parasito caracterizam a fase aguda da doença de Chagas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

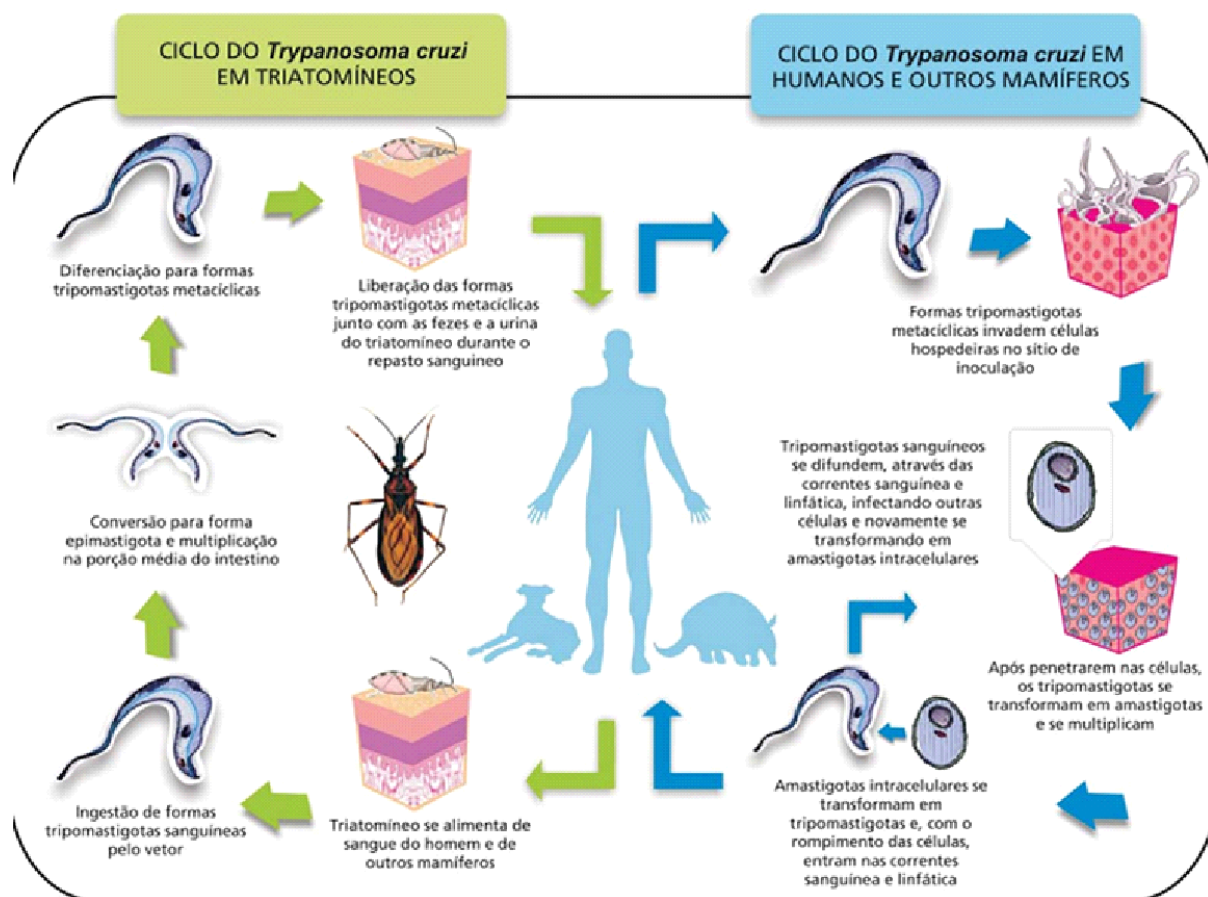


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (adaptado de ARGOLO et al., 2008).

1.2 A doença de Chagas, seus aspectos clínicos e epidemiológicos

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017). A maioria das pessoas infectadas com esta parasitose encontra-se na América Latina (WHO, 2017). Além da transmissão através das fezes de insetos-vetores, a doença de Chagas também pode ser transmitida por meio de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, via congênita (pela placenta ou pelo canal do parto no momento do nascimento) e por via oral, pela ingestão de comida ou bebida contaminadas com as fezes do ou o próprio inseto, infectados com o parasito (revisto por COURA, 2015). Devido à migração de pessoas infectadas, o número de casos da doença vem crescendo na Europa e nos Estados Unidos, em decorrência de transmissão através de transfusão de sangue e transplante de órgãos (SCHMUNIS; YADON, 2010).

No período inicial da infecção observa-se uma alta parasitemia e amplo parasitismo tecidual, além de uma forte resposta imune (Figura 2), caracterizando a fase aguda da infecção. Normalmente, o sistema imune do hospedeiro é capaz de controlar a parasitemia, mas é incapaz de eliminar completamente o parasito, ocorrendo assim a evolução da infecção para a fase crônica da doença. É na fase crônica que podem surgir as manifestações clínicas graves com quadros de cardiomiopatia, megaesôfago e/ou megacólon que caracterizam a doença de Chagas (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

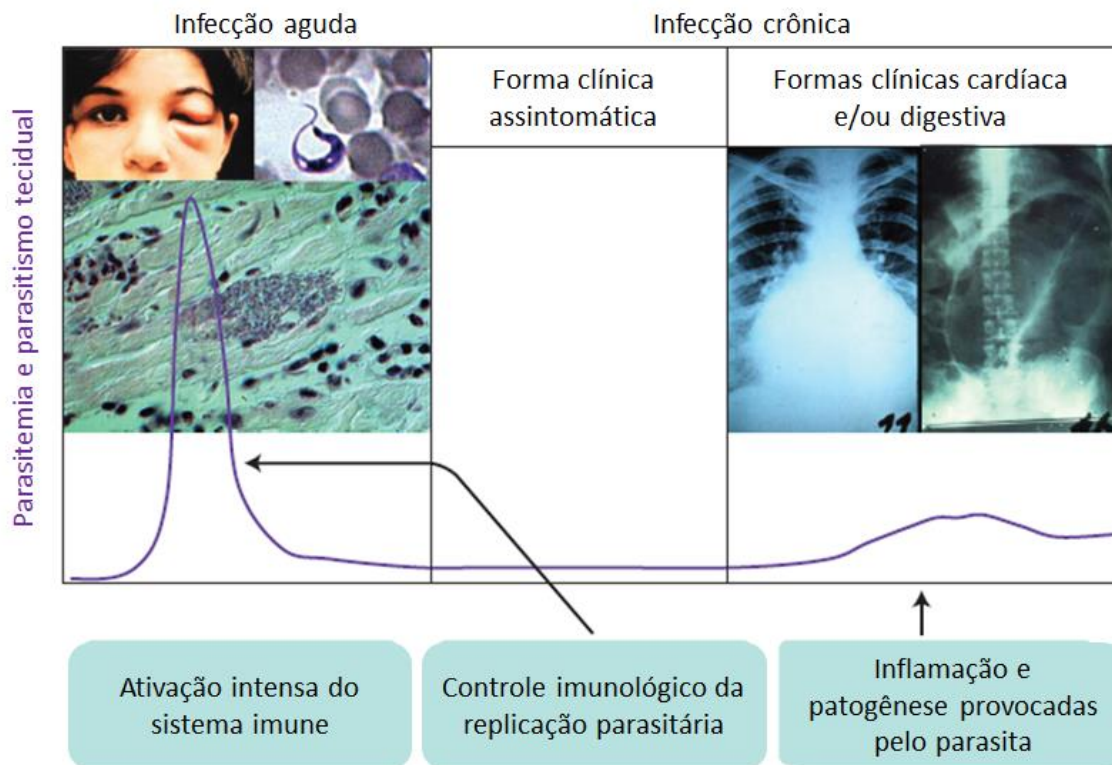


Figura 2. Fases clínicas da doença de Chagas (adaptado de JUNQUEIRA et al., 2010).

1.3A interação parasito-célula hospedeira e o ciclo intracelular do *T. cruzi*

As formas tripomastigotas do parasito iniciam a infecção interagindo com moléculas de superfície na membrana da célula hospedeira através de ligantes presentes em sua superfície ou secretados no meio extracelular (Figura 3). Acredita-se que qualquer classe de moléculas expostas na superfície da célula hospedeira tenha potencial para ser um receptor de *T. cruzi*. Alguns carboidratos como, galactosil, manosil e sialil, presentes na membrana plasmática das células hospedeiras de mamíferos, são internalizados com o parasito (BARBOSA; MEIRELLES, 1992), indício de que podem atuar como receptores. Alteração da quantidade destes glicosídeos na superfície celular podem alterar o padrão de invasão do parasito na célula. Por exemplo, células Lec2, uma linhagem mutante de células de ovário de hamster chinês (CHO – *Chinese Hamster Ovary cells*), a qual expressa poucos resíduos de ácido siálico na superfície, apresenta uma diminuição na invasão e na adesão do *T. cruzi* à sua superfície (CIAVAGLIA; DE CARVALHO; DE SOUZA, 1993).

Outras moléculas envolvidas em processos de invasão do *T. cruzi* são as integrinas. As integrinas são receptores que medeiam a ligação célula-célula ou célula-matriz extracelular, se ligam à laminina ou à fibronectina e atuam como receptores que podem ativar as vias de sinalização da PI-3 quinase (revisado por DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Uma proteína presente na membrana do *T. cruzi*, a Tc85, possui sequências de ligação semelhantes a fibronectina (ORTEGA-BARRIA et al., 1991) e um domínio de ligação à laminina (CIAVAGLIA; DE CARVALHO; DE SOUZA, 1993), indício de que possa estar envolvida com a invasão através de interações com integrinas.

Outra classe de receptores utilizados por tripomastigotas para invadir células de mamíferos, são os receptores de bradicinina. Esses receptores são acoplados à proteína heterotrimérica G e são formados por dois subtipos: o receptor de bradicinina 2 (B2R – *bradycin-2 receptor*), que é constitutivamente expresso por células cardiovasculares, e o receptor de bradicinina 1, cuja expressão é regulada positivamente nos tecidos lesados (SCHARFSTEIN et al., 2000). A superexpressão do B2R em células CHO revelou que a invasão de tripomastigotas é modulada por atividades combinadas de quinínógenos, quininogenases e peptidases degradantes de quinina. Através dele as tripomastigotas desencadeiam transientes de cálcio intracelular que podem auxiliar no processo de invasão por este parasito (revisado por DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Dentre as proteínas do parasito já identificadas como importantes moléculas envolvidas com o processo de invasão celular, podemos destacar os membros da super família gp85/*trans*-sialidase (TS), como gp82, gp90, gp35/50, os quais foram correlacionados com o início da infecção por formas tripomastigotas (EGIMA et al., 1996; WESTON; PATEL; VAN VOORHIS, 1999; DE PABLOS; OSUNA, 2012). Entre outras funções, as *trans*-sialidasas são enzimas descritas como de grande importância para a adesão do parasito à célula hospedeira. Estas enzimas promovem a transferência de resíduos de ácido siálico α -2,3-ligado a glicoconjugados presentes na célula hospedeira para moléculas de mucinas presentes na membrana do parasito. Estas últimas compõem uma grande família de proteínas de superfície altamente glicosiladas, ligadas a GPI (ANDREWS et al., 1987; SCHENKMAN et al., 1991, 1992). A adesão do parasito à célula hospedeira, a partir da sialilação de sua superfície, desencadeia sinalizações através da ativação

de vias diferentes como PI-3 quinase/Akt, MAP quinase e ERK (revisado por WALKER et al., 2013).

Outras moléculas presentes na superfície do parasito também participam no processo de adesão e internalização, e desencadeiam uma sinalização dependente de cálcio (Ca^{2+}) que promove o recrutamento de lisossomos para o local de entrada do parasito e conseqüentemente sua fusão com a membrana celular. Entre as moléculas conhecidas por induzir sinalização celular estão a cruzipaina, um fator solúvel de estrutura indefinida, o pequeno antígeno de superfície de tripomastigotas (TSSA – *Trypomastigote Small Surface Antigen*) e as já mencionadas, *trans*-sialidases.

A cruzipaina é expressa em todas as formas do parasito e em diferentes cepas (MURTA et al., 1990; PAIVA et al., 1998) e sua alta expressão não se correlaciona com a infectividade do parasito (PAIVA et al., 1998). Participa no processo de internalização e no desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* (MEIRELLES et al., 1992), sendo sua principal cisteína proteinase. Atua sobre o quinogênio celular, gerando bradiginina que, após o reconhecimento pelo B2R desencadeia o influxo Ca^{2+} mediado por IP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-3-fosfato), como mencionado anteriormente (SCHARFSTEIN et al., 2000).

Ainda, um fator solúvel de estrutura desconhecida foi identificado como sendo um componente produzido pela ação de uma enzima citosólica de *T. cruzi*, intimamente relacionada a família de prolil oligopeptidases, denominada oligopeptidase B (OPB) (BURLEIGH et al., 1997). Este componente, gerado a partir de uma molécula precursora no citoplasma de tripomastigotas seria exportado e funcionaria como um agonista de Ca^{2+} após ser reconhecido por um alvo receptor na célula hospedeira. A ativação deste receptor leva à ativação da fosfolipase C e produção de IP3, induzindo a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (CALER et al., 1998). CALER e colaboradores (2000), mostraram que tripomastigotas deficientes em OPB possuíam uma capacidade menor de invadir as células, uma atividade de indução de sinal de Ca^{2+} de baixa intensidade e recrutamento de lisossomos de forma significativamente atrasada. No entanto, sua propriedade para induzir elevação de cAMP nas células hospedeiras era conservada (RODRÍGUEZ et al., 1995).

CÁNEPA e colaboradores (2012) mostraram que peptídeos baseados no TSSA se ligam as células e induzem sinalização de Ca^{2+} . O TSSA é uma molécula

parecida com as mucinas e é rica em serina e treonina preditamente O-glicosiladas (DI NOIA et al., 2002). Sua expressão é restrita a superfície de tripomastigotas infectivas, derivadas de células, e funcionam como uma adesina envolvendo receptores na célula hospedeira (BALOUZ et al., 2015).

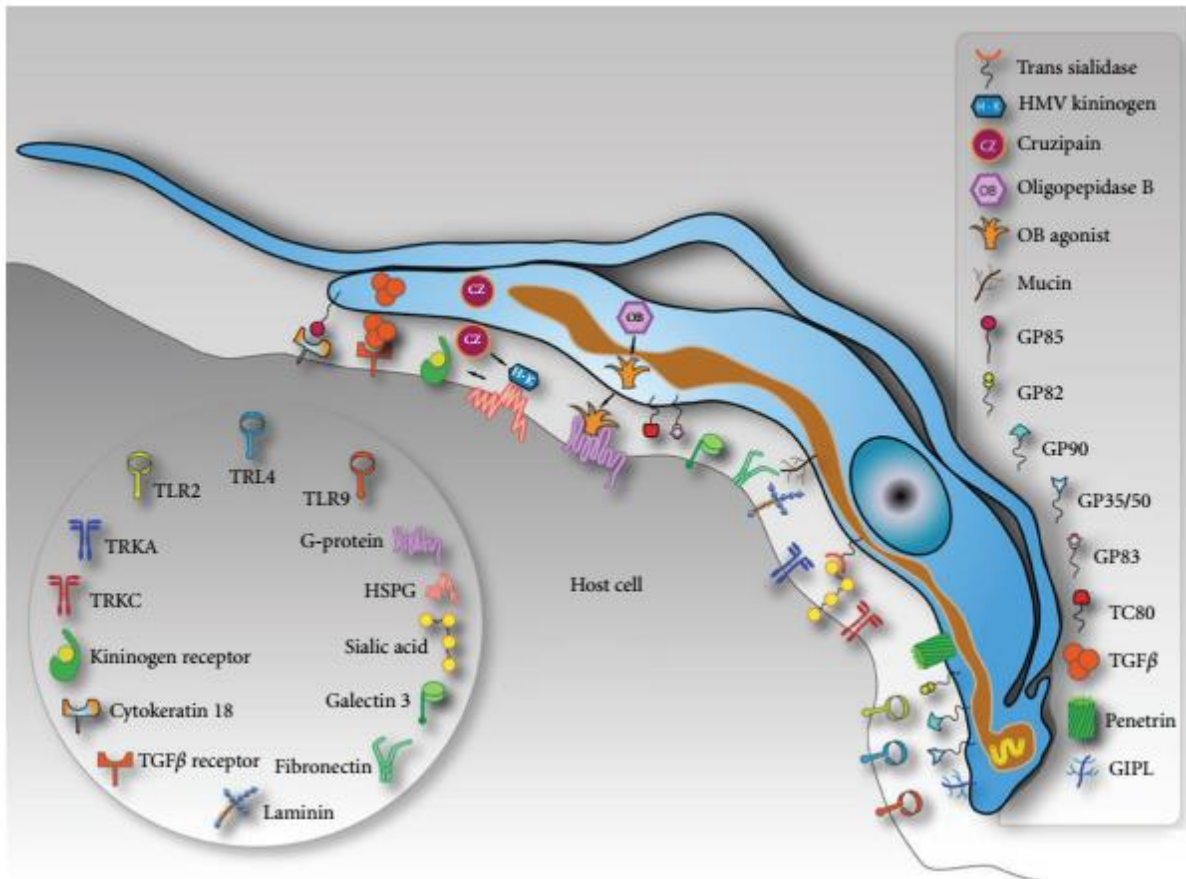


Figura 3. Modelo esquemático da superfície de uma célula e uma tripomastigota de *T. cruzi* hipotéticas resumindo as moléculas envolvidas na interação parasito-célula hospedeira (adaptado de DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

Hoje sabe-se que o *T. cruzi* usa o mecanismo de reparo de membrana da célula hospedeira para invadir células fagocíticas não profissionais, principal alvo da infecção por este parasito (FERNANDES et al., 2011). O modelo de reparo de membrana descrito por TAM e colaboradores em 2010, demonstra que a fusão dos lisossomos com a membrana celular, leva a um processo de endocitose compensatória que culmina com a internalização da região da membrana contendo a injúria, resselando a membrana. Neste modelo, quando a membrana sofre uma injúria há um influxo de íons cálcio (Ca^{2+}) que culmina com o recrutamento e fusão de lisossomos com a superfície celular. Esta exocitose de lisossomos ocasiona a liberação de esfingomielinase ácida, uma enzima lisossomal que, através da clivagem da esfingomielina presente na membrana celular, gera ceramida (TAM et al., 2010). A ceramida é um lipídeo que favorece a deformação da membrana e, por consequência, estimula a endocitose, levando à internalização das porções danificadas da membrana plasmática. Corrote e colaboradores (2013) observaram que as caveolas também desempenham papel no reparo de membrana e que a inibição de caveolina-1 (Cav-1) ou a depleção de colesterol inibem o reparo de membrana. Os autores propõem que após a exocitose lisossômica disparada pelo Ca^{2+} e a liberação de esfingomielinase ácida, as vesículas derivadas das caveolas se moveriam dentro das células enquanto passam por um processo de fusão homotípica, o que resultaria em grandes compartimentos de origem endocítica (CORROTTE et al., 2013). No caso do *T. cruzi*, a endocitose estimulada pela ceramida culmina com a internalização do parasito na célula hospedeira (FERNANDES et al., 2011; FERNANDES; ANDREWS, 2012).

Durante o processo de endocitose compensatória, a forma tripomastigota do parasito é então internalizada em um vacúolo formado por membrana plasmática e lisossomal (FERNANDES et al., 2011). Após a entrada, mais lisossomos vão se fundindo até que toda a superfície do vacúolo se encontra coberta com marcadores lisossomais. A fusão de mais lisossomos ao vacúolo parasitóforo é uma etapa crucial para a viabilidade da infecção uma vez que, sem esta fusão os parasitos podem escapar da célula hospedeira (ANDRADE; ANDREWS, 2004).

Após algum tempo de residência no vacúolo, o qual pode variar dependendo da cepa do parasito e da célula infectada (ANDRADE; ANDREWS, 2004, 2005), os parasitos escapam para o citosol da célula, se transformam na forma amastigota e iniciam seu processo de multiplicação intracelular. O conteúdo ácido dos lisossomos

fornece o ambiente ideal para o escape do vacúolo e posterior replicação do parasito no citosol da célula (revisado por ANDRADE; ANDREWS, 2005). O pH ácido do lisossomo parece favorecer a atividade da Tc-TOX, uma molécula secretada pelo parasito que permite a formação de poros na membrana do vacúolo parasitóforo e conseqüentemente permite seu escape para o citosol, após o rompimento da membrana vacuolar (ANDREWS et al., 1990 e revisado por ROMANO et al., 2012). Além disso, a remoção dos resíduos de ácido siálico de proteínas presentes na membrana do lisossomo pela ação das *trans*-sialidases do parasito parece tornar o lisossomo sensível à ação da Tc-TOX (ANDREWS; WHITLOW, 1989). Foi demonstrado ainda que a taxa de atividade de *trans*-sialidase pode interferir na velocidade de escape do parasito de seu vacúolo parasitóforo (RUBIN-DE-CELIS et al., 2006). Parasitos superexpressores de *trans*-sialidases ativas induzem um escape mais rápido do vacúolo parasitóforo para o citosol celular. Livre no citosol da célula, a forma tripomastigota se transforma na forma replicativa, amastigota, colonizando a célula e dando continuidade ao ciclo de vida do *T. cruzi*.

1.4 O papel das LAMPs na infecção celular pelo *T. cruzi*

O lisossomo é uma importante organela para o sucesso da infecção celular pelo *T. cruzi* (TARDIEUX et al., 1992) e para sua retenção na célula hospedeira (ANDRADE; ANDREWS, 2004). Essa organela possui glicoproteínas presentes em sua membrana, ricas em ácido siálico, conhecidas como LAMP (*Lysosome-Associated Membrane Protein*) (KORNFELD; MELLMAN, 1989). As proteínas LAMP se apresentam sob duas isoformas principais: LAMP-1 e LAMP-2 (CHEN et al., 1985). Ambas isoformas consistem em um polipeptídeo, cuja maior parte encontra-se no lúmen do lisossomo e que é conectada a um domínio transmembrana, o qual se conecta a uma pequena cauda citoplasmática (Figura 4). Embora estruturalmente muito parecidas, suas sequências divergiram ao longo da evolução, sendo o grau de similaridade entre as isoformas em torno de 37%. Este fato pode ser comprovado pela localização de suas sequências em cromossomos diferentes (revisado por FUKUDA, 1991). De acordo com MATTEI et al. (1990) sua divergência ocorreu precocemente na evolução.

ANDREJEWSKI e colaboradores (1999) observaram que camundongos deficientes para LAMP1 (KOL1) embora férteis, viáveis e com propriedades lisossomais normais, apresentavam alterações na imunorreatividade cerebral a Catepsina-D e uma leve astrogliose regional. Os autores ainda observaram um aumento nos níveis de LAMP2 nos rins, baço e coração desses camundongos, inclusive em tecidos que não possuíam apenas um alelo LAMP1, indicando que os mecanismos podem estar correlacionados e que os níveis elevados de LAMP2 compensaram a deficiência de LAMP1. Por outro lado, a deficiência em LAMP2 (KOL2) causou severos sintomas nos animais levando-os a morte 20-40 dias após o nascimento. Observou-se nesses camundongos, um acúmulo e aumento no número de vacúolos autofágicos em tecidos como fígado, coração, rim e músculo esquelético, além do aumento na meia vida de autofagossomos em hepatócitos (TANAKA et al., 2000). Nestes hepatócitos, a degradação de proteínas de longa vida é prejudicada. Estes fatos foram atribuídos a uma deficiência na reciclagem do receptor da manose 6-fosfato de 46 kDa dos endossomos de volta à rede trans Golgi (ESKELINEN et al., 2002).

Animais deficientes em LAMP1 e LAMP2 (KOL1/L2) morrem ainda em estágio embrionário (ESKELINEN et al., 2004). Seus tecidos apresentam muito mais vacúolos citoplasmáticos do que os animais selvagens e grande parte desses vacúolos é autofágica e apresentam atrasos nas etapas finais de maturação (ESKELINEN et al., 2004). A capacidade fagocítica de células KOL1/L2 é normal, no entanto ocorre um atraso na maturação das vesículas endocíticas comprometendo a fusão com vesículas lisossomais (HUYNH et al., 2007). Esses autores ligaram esta deficiência com uma menor mobilidade dos lisossomos, provavelmente por uma dificuldade no recrutamento de proteínas motoras.

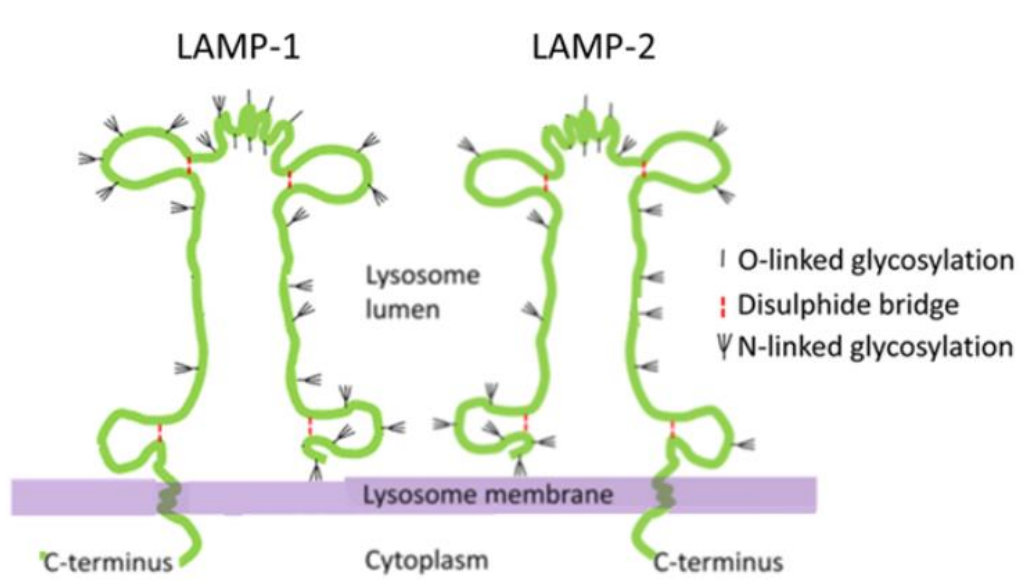


Figura 4. Esquema da estrutura das proteínas LAMP-1 e LAMP-2 e sua localização no lisossomo. (Adaptado de ESKELINEN; TANAKA; SAFTIG, 2003).

Estudos recentes vêm demonstrando que as proteínas LAMP desempenham papéis importantes no curso da infecção pelo *T. cruzi*. Um destes estudos mostrou que células duplo deficientes para LAMP1/2 (KOL1/L2) se mostram menos permissivas à entrada do *T. cruzi* quando comparadas às células com fenótipo selvagem (ALBERTTI et al., 2010). Este mesmo estudo mostrou que a diminuição na taxa de invasão pelo *T. cruzi*, observada nestas células, não se devia à incapacidade das células de reter o parasito, como acontece quando há a diminuição da fusão de lisossomos induzida por inibidores de PI-3 quinase. Albertti e colaboradores (2010) também observaram que após 72 h de infecção, as células KOL1/L2 apresentavam um número maior de parasitos em seu citoplasma do que as células selvagens, indicando que a ausência de LAMP interfere não só com a invasão, mas também com o comportamento intracelular do parasito. Este efeito de LAMP na invasão e desenvolvimento intracelular do *T. cruzi* foi observado para as cepas Y e CL Brener do parasito, demonstrando a importância desta proteína no curso da infecção.

Procurando compreender melhor o papel de LAMP na infecção celular pelo *T. cruzi*, nosso grupo observou que apenas a ausência de LAMP-2 já é suficiente para diminuir as taxas de invasão pelo *T. cruzi*, (COUTO et al., 2017). Neste estudo, Couto e colaboradores demonstraram que células deficientes para LAMP2 (*knock*

out para LAMP2 ou LAMP1) eram capazes de realizar a exocitose de lisossomos, porém apresentavam um comprometimento na endocitose compensatória, processo importante durante o reparo de membrana. De fato, essas células quando eram submetidas a injúria mecânica apresentavam um maior número de células mortas, indicando que seu processo de reparo de membrana estava prejudicado. Este defeito na endocitose compensatória pode ser decorrente da diminuição de caveolina observada na superfície celular. Esses dados revelam o papel majoritário de LAMP-2 na infecção pelo parasito.

1.5 As microvesículas do *T. cruzi* e seu papel na infecção celular

As microvesículas, também conhecidas como micropartículas, ectossomos, exossomos ou vesículas derivadas de membrana plasmática são estruturas complexas que carregam várias moléculas derivadas da célula, como lipídios, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos (miRNAs e mRNAs) (revisado por CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Em infecções parasitárias, são observadas tanto microvesículas secretadas por patógenos extracelulares ou produzidos por células hospedeiras infectadas por patógenos intracelulares (TWU; JOHNSON, 2014). As microvesículas podem mediar interações parasito-parasito ou parasito-célula hospedeira. Exossomos derivados de células hospedeiras infectadas ativam a comunicação à distância entre parasitos e facilitam a dispersão de fatores de virulência (MANTEL; MARTI, 2014). A secreção de microvesículas no parasito *T. cruzi*, ocorre de modo espontâneo mas também pode ser induzida por estresse nutricional ou químico (BAYER-SANTOS et al., 2013; DA SILVEIRA; ABRAHAMSOHN; COLLI, 1979; MARCILLA et al., 2014; TORRECILHAS et al., 2009; 2012).

As microvesículas do *T. cruzi* podem conter fatores de virulência envolvidos em: (i) invasão celular e desenvolvimento intracelular do parasito; (ii) evasão do sistema imune; (iii) aumento do parasitismo cardíaco, inflamação e arritmia que contribuem para a patogênese da doença de Chagas. Em sua maioria esses fatores são proteínas associadas a membrana plasmática via âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol) como: *trans*-sialidases, glicoproteínas (TS/SAPA, Tc85, gp82, gp90, CRP, TESA), proteínas MASP (*mucin-associated surface proteins*),

cruzipaina, gp63, mucinas, proteínas ricas em serina-, alanina- e prolina- (SAP) (Figura 5) (revisado por WATANABE COSTA; DA SILVEIRA; BAHIA, 2016).

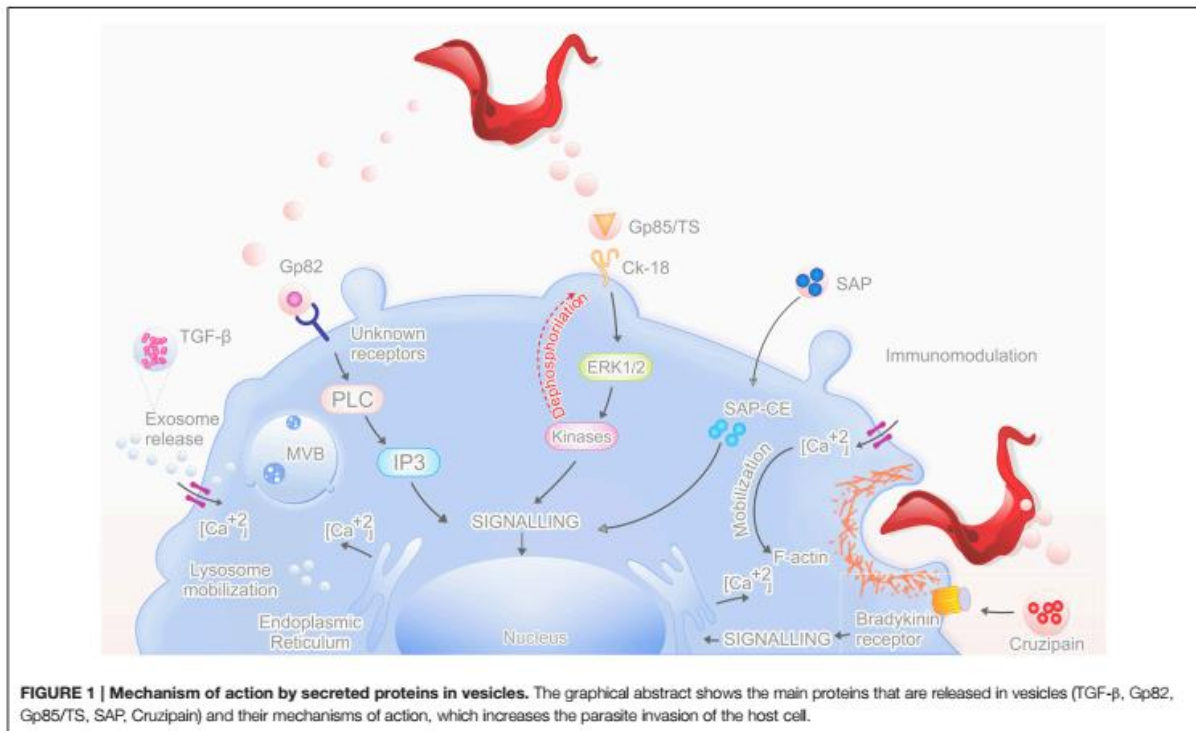


Figura 5. Mecanismo de ação de proteínas secretadas em vesículas (adaptado de BORGES et al., 2016).

Uma das glicoproteínas presente em microvesículas liberadas pelo *T. cruzi* é a GP82, uma molécula de adesão celular que se liga a célula hospedeira e está implicada na invasão de cepas altamente infectivas do parasito (RAMIREZ et al., 1993). A cascata de sinalização induzida pela gp82 quando esta se liga a receptores presentes na superfície da célula hospedeira, os quais são ainda desconhecidos, inclui a participação da fosfolipase C, que gera IP3 o qual gera mobilização de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (YOSHIDA, 2006; YOSHIDA et al., 2000). O aumento do Ca^{2+} leva a uma reorganização rápida e transitória de microfilamentos das células hospedeiras, incluindo a desmontagem do citoesqueleto de actina, facilitando a invasão pelo parasita (DORTA et al., 1995; MARTINS et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 1995; RUIZ et al., 1998)

Cestari e colaboradores (2012) observaram que o *T. cruzi* induzia a liberação de vesículas derivadas da membrana da célula hospedeira para evadir do sistema imune inato. Essas vesículas eram capazes de inibir a lise mediada pelo sistema complemento bem como facilitar a invasão celular pelo parasito. Torrecilhas e

colaboradores (2009) já haviam demonstrado que as microvesículas de tripomastigotas de cultura do *T. cruzi* aumentavam a infecção no tecido cardíaco devido a uma resposta inflamatória exacerbada. No parasito *Trichomonas vaginalis*, a liberação de microvesículas leva a um aumento na adesão do parasito às células epiteliais e a uma modulação negativa do sistema imune inato (TWU et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada ainda sem vacina disponível e os tratamentos disponíveis causam efeitos colaterais indesejáveis (BUSTAMANTE; TARLETON, 2015; CAZORLA et al., 2015; GUPTA; GARG, 2015; URBINA; DOCAMPO, 2003; WILKINSON et al., 2008). Faz-se cada vez mais necessária a descoberta de moléculas-alvo para o desenvolvimento de fármacos e vacinas contra seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A compreensão dos mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro e dos mecanismos celulares subvertidos pelo parasito poderiam auxiliar nesta descoberta.

Como descrito anteriormente neste volume, sabe-se que o *T. cruzi* subverte o mecanismo de reparo de membrana para invadir as células (FERNANDES et al., 2011). A interação do parasito com a célula induz uma sinalização de Ca^{2+} através de microinjúrias e/ou da interação de moléculas do parasito com receptores da célula hospedeira (WALKER et al., 2013). Essa sinalização leva a exocitose de lisossomos e consequente endocitose compensatória culminando na internalização do parasito.

Trabalhos do nosso grupo, como o de COUTO e colaboradores (2017) mostraram que a ausência da proteína lisossomal LAMP-2 interfere na entrada do parasito pois impacta nos processos de reparo de membrana da célula. As células deficientes em LAMP2 apresentam uma alteração na distribuição de caveolina na superfície celular, um marcador de caveolas que são balsas de membrana importantes para o processo de endocitose compensatória que, por sua vez, faz parte do processo de reparo de membrana. Outro trabalho do nosso grupo também mostrou que tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* apresentavam uma maior multiplicação intracelular em células deficientes para as isoformas de LAMP (LAMP1 e LAMP2) (PEDERSANE, 2014).

Diante desses dados, nos indagamos se o ambiente intracelular ausente em LAMP, uma proteína altamente rica em ácido siálico, importante para o parasito, e que ao mesmo tempo interfere com a homeostase de colesterol da célula, poderia induzir alterações na infectividade do *T. cruzi*. DOS SANTOS e colaboradores (2012) mostraram que tripomastigotas derivadas de tipos celulares distintos apresentam uma infectividade diferente entre si e maior para as células das quais se

derivaram. Ou seja, pequenas alterações no ambiente celular são capazes de induzir mudanças nas características do parasito podendo impactar em sua interação com as células.

Dessa forma, compreender os mecanismos e o papel de componentes celulares que regulam a infecção pelo *T. cruzi*, além de fundamental para o entendimento da doença como um todo, pode abrir oportunidades para o desenvolvimento de drogas que atuem eliminando o parasito sem efeitos colaterais para o organismo do hospedeiro.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da ausência de LAMP e ambiente intracelular no perfil de formas tripomastigotas de *T. cruzi* liberadas durante a infecção em fibroblastos selvagens (WT) e deficientes em LAMP1/LAMP2 (KOL1/L2) ou apenas LAMP2 (KOL2).

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a taxa de invasão de formas infectantes do parasito *T. cruzi* provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em fibroblastos WT e células da linhagem LLC-MK2;
- Avaliar a taxa de adesão de formas infectantes do parasito *T. cruzi* provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em fibroblastos WT e células da linhagem LLC-MK2;
- Avaliar o nível de injúria celular causado pela infecção com formas infectantes do parasito *T. cruzi* provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em fibroblastos WT e células da linhagem LLC-MK2;
- Avaliar qualitativamente a sinalização de cálcio induzida por formas infectantes do parasito *T. cruzi* provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em fibroblastos WT e células da linhagem LLC-MK2;
- Avaliar o estresse oxidativo em fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 induzido pela infecção celular com formas infectantes da cepa Y de *T. cruzi* obtidas de células LLC-MK2;
- Avaliar o papel de LAMP no recrutamento de proteínas +TIP de microtúbulos;
- Avaliar o perfil de microvesículas secretadas por formas infectantes do parasito *T. cruzi* provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultivo de células da linhagem LLC-MK2

Células da linhagem LLC-MK2, células epiteliais de rim de macaco (HULL; CHERRY; TRITCH, 1962) foram mantidas em cultivo em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/high glucose* - Invitrogen) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Gibco), inativado a 56°C por 30 min (ADESSE et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2012). Após a obtenção de uma monocamada de células em garrafa de cultivo celular de 75cm², as células foram lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*), tripsinizadas com solução de Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco) e ressuspensas com meio DMEM. As células foram semeadas na proporção 1:10 para manutenção do cultivo e na proporção de 1:20 para a infecção com os parasitos. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células foram rotineiramente testadas para contaminação com *Mycoplasma* sp (TIMENETSKY et al., 2006) por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

4.2. Cultivo de fibroblastos murinos

Linhagens de fibroblastos embrionários obtidas a partir de embriões de camundongos C57BL6 tipo selvagem (WT), deficientes para LAMP2 (KOL2) ou deficientes para ambas isoformas de LAMP, LAMP1 e LAMP2 (KOL1/L2), e espontaneamente imortalizados em cultura, foram gentilmente cedidas pelo grupo do Professor Paul Saftig (*Biochemisches Institut/Christian-Albrechts-Universität Kiel, Alemanha*). Uma monocamada subconfluyente de cada uma das linhagens (WT, KOL2 ou KOL1/L2) foi mantida em garrafas de cultivo celular de 25cm², em meio DMEM suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Gibco). As células foram ressemeadas três vezes por semana e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células foram rotineiramente testadas para contaminação com *Mycoplasma* sp por meio de PCR.

4.3. Cultivo de formas tripomastigotas

Tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y (DTU TcII) (ZINGALES et al., 2009) foram utilizadas para infectar células da linhagem LLC-MK2 e fibroblastos murinos, cultivadas como descrito anteriormente (itens 1 e 2). As células foram infectadas com 3×10^6 parasitos por cerca de 24hs e mantidas em meio DMEM suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) e 2% de soro fetal bovino (Gibco) a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂ (ANDREWS et al., 1987). Durante o cultivo, tanto as células hospedeiras quanto os parasitos foram testados por PCR para detectar contaminação por *Mycoplasma* sp. e utilizados nos experimentos somente quando negativos para este teste.

4.4. Monitoramento das culturas para contaminação com *Mycoplasma* sp.

Testes para averiguar a existência de contaminação por *Mycoplasma* sp. nas culturas celulares de LLC-MK2, de fibroblastos e nas formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram realizados utilizando-se iniciadores descritos por Timenetsky et al., (2006), para amplificar parte do gene da subunidade 16S do RNA ribossomal de qualquer espécie do gênero *Mycoplasma* pelo método de PCR. Aproximadamente 500 µL da suspensão de células ou de tripomastigotas foram coletados e aquecidos a 70°C por 30 minutos em banho-maria. Para a PCR foram utilizados 1µL da suspensão de células aquecida, tampão *Green GoTaq* 1X (Promega), 200 µM de dNTPs (dTTP, dATP, dGTP e dCTP), 2 µM do iniciador MGSO [TGCACCATCTGTCACCTCTGTAAACCTC] e 2 µM do iniciador GPO3 [GGGAGCAAACAGGATAGATACCCT] e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Phonetrria) para cada 30 µL de reação. As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, por último, extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V em tampão TAE 1X (4,8g/L de Tris-base pH 8,0; 1,14mL de ácido acético glacial; 2mL de EDTA 0,5M), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado por exposição à luz UV.

4.5. Tipagem dos fibroblastos para fenótipo deficiente para LAMP

Para assegurar o fenótipo selvagem ou deficiente para LAMP dos fibroblastos cultivados os fibroblastos foram tipados bimensalmente. Para tanto, os fibroblastos foram plaqueados sobre lamínulas na proporção de 5×10^4 células por poço em duplicata para cada tipo celular. Após 24hs, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) em PBS suplementado com $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (*Phosphate Buffered Saline* contendo 0,133 g/L CaCl_2 e 0,1 g/L de MgCl_2 - $\text{PBS}^{+/+}$) durante 30 min a temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com $\text{PBS}^{+/+}$, incubadas por 20 min com $\text{PBS}^{+/+}$ contendo 2% de Soro-albumina Bovina (BSA – *Bovine Serum Albumine* – Invitrogen) e 0,5% de Saponina (PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%). Posteriormente, as lamínulas foram incubadas por 45 min com anticorpo anti-Lamp 1 ou anti-Lamp 2 diluídos 1:50 em PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%. As lamínulas foram lavadas 3x com PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%, incubadas por 30 min com anticorpo anti-rato conjugado com Alexa 488 diluído 1:250 em PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%, novamente lavadas 3x com PBS/BSA 2%/Saponina 0,5%, lavadas 3x com $\text{PBS}^{+/+}$, coradas por 1 min com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole* - Invitrogen) diluído 1:1000 em $\text{PBS}^{+/+}$ e lavadas 3x com $\text{PBS}^{+/+}$, quando foram então montadas sobre lâmina em gel de montagem *anti-fading* (*PPD-p-Fenilenodiamina* 0,1% em solução de glicerol:Tris1,5M–9:1). As lâminas foram visualizadas e analisadas em microscópio de fluorescência.

4.6. Ensaios de invasão celular do *T. cruzi*

Para os ensaios de invasão utilizando formas tripomastigotas de *T. cruzi* derivadas de células LLC-MK2 ou fibroblastos WT, KOL1/L2 ou KOL2, fibroblastos WT e células LLC-MK2 foram plaqueadas na proporção de 5×10^4 células por poço, 24h antes da exposição aos parasitos. A exposição aos parasitos foi realizada com uma MOI de 50 parasitos por célula por 40 minutos à 37°C e 5% de CO_2 . Após esse período, as células foram lavadas com $\text{PBS}^{+/+}$ aquecido a 37°C, para a retirada dos parasitos não internalizados e fixadas com PFA 4% por 24h à 4°C.

Para a marcação com anticorpos, as lamínulas foram retiradas do fixador e lavadas por 3 vezes com $\text{PBS}^{+/+}$, em seguida incubadas durante 20 min em PBS/BSA 2%. Para a identificação dos parasitos extracelulares remanescentes, as lamínulas foram incubadas por 50 min com anticorpo primário anti-*T. cruzi* (soro de

coelho imunizado com tripomastigotas de *T. cruzi*, como descrito previamente - ANDREWS et al., 1987), diluído 1:500 em PBS/BSA 2%. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 4 vezes com PBS/BSA 2% e incubadas por 40 min com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 546 (Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes) numa diluição de 1:500 em PBS/BSA 2%. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS/BSA 2% e mais 3 vezes com PBS^{+/+}. O DNA da célula hospedeira e do parasito foram marcados por incubação com DAPI diluído 1:1000 em PBS^{+/+} durante 1 min e então as lamínulas foram lavadas com PBS^{+/+} para a montagem sobre lâmina para microscopia com gel de montagem. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência onde foram contados aproximadamente 18 campos por lamínula, garantindo a contagem de um número mínimo de 250 células.

4.7. Ensaios de adesão celular do *T. cruzi*

Os ensaios de adesão de formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram realizados segundo protocolo descrito anteriormente por (SCHENKMAN; DIAZ; NUSSENZWEIG, 1991). As células LLC-MK2 e os fibroblastos WT foram plaqueadas sobre lamínulas e, após 24 h, lavadas duas vezes com HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) aquecido. Em seguida, as células foram pré-fixadas com glutaraldeído 2% (Sigma- Aldrich) em PBS^{+/+} por 5 min à 4°C. Seguindo esta etapa, as células foram lavadas com PBS e permaneceram em solução de etanolamina a 0,16 M pH 8,3 por pelo menos 24 h. Após este passo, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e 1 vez com DMEM/ BSA 0,2%. Tripomastigotas provenientes de células LLC-MK2 ou dos fibroblastos (WT, KOL1/L2 e KOL2) foram ressuspensas em DMEM/BSA 0,2% e incubadas por 40 min, a uma MOI de 50, com os fibroblastos ou as células LLC-MK2, separadamente. Após o período de incubação, as tripomastigotas foram retiradas e as células lavadas gentilmente com HBSS para a retirada dos parasitos não aderidos. Em seguida, as células foram fixadas com Bouin (19 mL de solução saturada de ácido pícrico e 1 mL de ácido acético) e coradas com Giemsa para a análise da adesão do *T. cruzi*.

4.8. Ensaio de estresse oxidativo

Para os ensaios de estresse oxidativo, fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 foram plaqueados em placas de vinte e quatro poços em uma concentração de 5×10^4 células por poço. Após 24h as monocamadas foram expostas por 40 min às formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* produzidas por culturas de células LLC-MK2 (MOI 50) ou expostas ao meio de cultura sem parasitos. Aproximadamente 48h após a exposição aos parasitos ou ao meio somente, as células foram incubadas com 10 μ M da sonda CM-H₂DCFDA (5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester – Molecular Probes) por 30 min a 37°C antes da leitura no aparelho Varioskan Flash (Thermo Fisher), um leitor multimodular de varrimento espectral que inclui intensidade de fluorescência, fluorescência resolvida no tempo, fotométrica e outras tecnologias de detecção luminométrica (<https://us.vwr.com/store/product/4784681/varioskan-flash-spectral-scanning-multimode-readers-thermo-scientific>). A sonda CM-H₂DCFDA é usada para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio nas células. Esta sonda é capaz de se difundir no interior das células, onde seus grupos acetatos são clivados por esterases intracelulares e seu grupo reativo, clorometil tiol, reage com a glutathiona e outros tióis intracelulares. Esta oxidação leva a uma molécula resultante fluorescente que permanece no interior da célula tornando possível a mensuração das espécies reativas presentes nas células. A leitura da fluorescência emitida pela oxidação da sonda foi feita durante cerca de 68 min, aproximadamente um total de 140 leituras.

4.9. Ensaio de injúria celular causada por parasitos derivados de fibroblastos selvagens e deficientes para LAMP e de células LLC-MK2

Para os ensaios de injúria, fibroblastos WT ou células LLC-MK2 foram plaqueados em placas de vinte e quatro poços em uma concentração de 5×10^4 células por poço. Após 24h as monocamadas foram expostas por 30 min às seguintes condições: 1. meio de cultura somente; 2. meio de cultura contendo iodeto de propídeo (10 μ g/mL); 3. meio contendo iodeto de propídeo (10 μ g/mL) e parasitos derivados de células WT, KOL1/L2 ou KOL2 a uma MOI de 100. Após o período de exposição, as células foram lavadas 1 vez com PBS, tripsinizadas, coletadas em

tubo e levadas para análise em citometria de fluxo (FACS Scan, Benton Dickinson). Os dados foram analisados no software FlowJo v.10.1 (Tree Star, Inc.).

4.10. Obtenção de fibroblastos *knock outs* para Clasp -1 α por meio do sistema CRISPR-Cas9

Para a obtenção de células *knock outs* para a proteína +TIP Clasp1 α foi utilizado o método de edição gênica CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – Caspase 9*). O primeiro passo do protocolo consistiu na obtenção do plasmídeo pSpCas9 (BB) contendo os RNAs guias, para isso foram desenhadas sequências de 20 nucleotídeos com o auxílio da ferramenta *CRISPR Design Tool* (<http://tools.genome-engineering.org>). Após a síntese dessas sequências deu-se o início do protocolo de clonagem no vetor.

- Preparação dos insertos dos RNAs guias:

Para esta etapa foi feita uma reação nas seguintes especificações: 1 uL do RNA guia *forward* a 100uM [CACCGTCTATGGTAACGCCAGCGC], 1 uL do RNA guia *reverse* a 100 uM [AAACGCGCTGGGCGTTACCATAGAC], 1 uL de tampão de ligação da T4 10x (NEB), 1 uL da T4 Polynucleotide Kinase (NEB) e água suficiente para o volume final de 10 uL. A reação foi feita a 37°C por 30 min, 95°C por 5 min com ramp down até 25°C diminuindo 5°C por min.

Ao final a reação foi diluída 200 vezes para a clonagem no vetor.

- Clonagem dos insertos no vetor:

Para a clonagem dos oligos no vetor foi feita uma reação nas seguintes especificações: 100 ng do vetor pSpCas9 (BB), 2 uL do oligo duplex (1:200), 1 uL do tampão Tango 10x (Promega), 1 uL de DTT a 10 mM (Invitrogen), 1 uL de ATP a 10 mM (NEB), 1 uL da enzima Bpil, 0,5 uL da enzima T4 ligase e água suficiente para o volume final de 20 uL. A reação foi feita nas condições de 6 ciclos a 37°C por 5 min e 21°C por 5 min. Ao final a reação foi submetida a uma etapa de purificação com exonuclease.

- Digestão de DNAs residuais – purificação da ligação:

Para a digestão de DNAs residuais linearizados, a reação de ligação foi tratada com uma exonuclease de acordo com as seguintes especificações: 11 uL da reação de ligação, 1,5 uL do tampão PlasmidSafe 10x (EpiCentre), 1,5 uL de ATP a

10 mM (NEB) e 1 uL de PlasmidSafe exonuclease (EpiCentre). A reação foi feita nas condições de 37°C por 30 min e 70°C por 30 min.

Para a transformação das bactérias com o vetor, foram aplicados 2uL da reação às bactérias que foram mantidas 30 min no gelo, colocadas a 42°C por 30 seg e novamente colocadas no gelo por 2 min, posteriormente foram acrescentados 950 uL de meio LB e as bactérias foram mantidas sob agitação de 200 rpm a 37°C por 60 min. Após esse período foram plaqueados 100uL das bactérias em meio LB Ágar contendo 100ug/mL de ampicilina para obtenção de colônias isoladas.

Após a obtenção das colônias isoladas, as bactérias foram inoculadas em 5mL de meio LB líquido contendo 100ug/mL de ampicilina e mantidas sob agitação de 180 rpm a 37°C por 12-16hs. O DNA plasmidial foi obtido através de miniprep utilizando o kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 e a sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TAE 1x, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Após a verificação da qualidade, o DNA foi utilizado em uma reação de PCR para avaliar a correta inserção dos RNAs guias no plasmídeo. Para esta reação foi utilizado 1µL do DNA obtido na miniprep, tampão Green GoTaq 1X (Promega), 200 µM de dNTPs (dTTP, dATP, dGTP e dCTP), 2 µM do iniciador U6 promoter [GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC] e 2 µM do iniciador Clasp1_CRISPR1_R (RNA guia *reverse*) [AAACGCGCTGGGCGTTACCATAGAC] e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria) para 25 µL de reação. As reações (teste e controle negativo) foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento dos iniciadores a 62°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, por último, extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V em tampão TAE 1X (4,8g/L de Tris-base pH8,0; 1,14mL de ácido acético glacial; 2mL de EDTA 0,5M), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado por exposição à luz UV. Com a confirmação de que os RNAs guias foram inseridos corretamente, procedeu-se então uma maxiprep para obtenção de quantidades maiores de DNA.

Para a obtenção do DNA, uma colônia bacteriana transformada com o plasmídeo para o CRISPR foi pré-inoculada em 5 mL de meio LB contendo 100 ug/mL de ampicilina e incubada a 37 °C por 8 h sob agitação de 180 rpm,

posteriormente 2 mL foram inoculados em 200 mL de meio LB contendo 100 ug/mL de ampicilina e incubado a 37 °C por 16h sob agitação de 180 rpm. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o Kit Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega), conforme instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 e a sua qualidade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1x, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

Após a conferência da qualidade do DNA plasmidial, células WT, KOL1/L2 ou KOL2 foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 5x10⁴ células por poço e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ por 24h antes da transfecção com o DNA. A transfecção das células foi realizada com 500 ng de DNA (cerca de 0,5 uL), 48 uL de meio sem soro fetal bovino por poço e 1,5 uL do reagente Fugene HD (Promega) por poço (proporção reagente:DNA = 3:1). Após a adição do reagente de transfecção o mix foi incubado por 15 min a temperatura ambiente e os 50 uL de volume final foram adicionados às células. Aproximadamente 48h após a adição do mix de transfecção, o meio foi trocado por meio contendo o antibiótico Puromicina na concentração de 3,0ug/mL para as células WT e KOL2 e de 1,5ug/mL para as células KOL1/L2. A seleção com o antibiótico foi realizada por 72h antes do isolamento das células por citometria de fluxo (FACS Scan, Benton Dickinson). Após a seleção as células foram postas em cultivo celular como descrito no item 1.2.

4.11. Microvesículas de tripomastigotas liberadas de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2

Para a obtenção das microvesículas, fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 foram infectados com tripomastigotas da cepa Y derivadas de células LLCMK2. Os parasitos foram coletados logo após a liberação e submetidos ao protocolo de purificação de microvesículas. Primeiramente o sobrenadante das culturas, contendo o parasito, foi centrifugado a 800g por 10 min e incubado a 37°C por 2h para que eventuais debris celulares e formas amastigotas presentes pudessem ser baixados pela rotação e as formas tripomastigotas, que são natantes e de nosso interesse, pudessem se concentrar ao longo do sobrenadante no tubo. Após esta etapa, esse sobrenadante, contendo majoritariamente tripomastigotas, foi coletado e centrifugado a 3000g por 15 min e as tripomastigotas ressuspensas em 15 mL de

solução salina tampão fosfato 0,1 M estéril (PBS - *Phosphate Buffer Saline*). O número de tripomastigotas do precipitado foi contado em câmara de Neubauer, e cerca de 10^8 - 10^9 tripomastigotas/mL foram utilizadas para a obtenção das microvesículas. As tripomastigotas foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 1ml de meio DMEM com 2% de glicose, incubadas por 2 hs à 37°C em estufa umidificada, em atmosfera de 5% de CO₂. Após esta etapa, foram novamente centrifugadas por 10 min e o sobrenadante coletado e filtrado em membrana de 0.45µm. As vesículas foram quantificadas no NTA e o meio DMEM com 2% de glicose foi usado como controle negativo nos ensaios de dessalinização/fracionamento, no NTA e LC-MS/MS.

4.12. Ensaios de sinalização de cálcio em fibroblastos WT e células LLC-MK2 com parasitos derivados de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2

Para estes ensaios, fibroblastos WT e células LLC-MK2 foram plaqueadas, 24h antes, na proporção de $2,5 \times 10^4$ células por divisão em placas confocais divididas em quatro. O carregamento das células com sensor de cálcio fluorescente, foi realizado incubando as células com uma solução contendo 5µM de Fluo-4/AM (Thermo Fisher), 0,01% de ácido plurônico e 2,5mM de Probenecid (Sigma), por 40min a 37°C. Após esta etapa, as células foram analisadas em microscópio confocal (Nikon), utilizando o re a partir do recurso de *time lapsing*, onde foram fotografadas por 180 segundos em intervalos de 8,2 segundos. Imediatamente após o início das coletas das imagens foi adicionado as células ionomicina (5µM) ou parasitos provenientes dos diferentes tipos celulares (WT, KOL1/L2 ou KOL2 - MOI 100).

5 RESULTADOS

5.1. Análise da taxa de invasão de tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2

Como demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo, tripomastigotas provenientes de infecções em células LLC-MK2 apresentam uma menor taxa de invasão e de adesão em fibroblastos deficientes para LAMP (KOL1/L2 ou KOL2) quando comparados a fibroblastos selvagens (WT), mostrando que células duplo deficientes em LAMP (KOL1/L2) são menos susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* (PEDERSANE, 2014; COUTO et al, 2017). Com o objetivo de compreender se a ausência de LAMP poderia induzir mudanças na infectividade dos parasitos, ensaios de invasão em fibroblastos WT e células LLC-MK2, utilizando tripomastigotas derivadas de infecções em fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 foram realizados.

Para os ensaios de invasão, fibroblastos WT e células LLC-MK2 foram plaqueadas em placa de vinte e quatro poços. Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as monocamadas foram expostas às formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* derivadas de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2, lavadas, fixadas e processadas para imunofluorescência como descrito na metodologia.

Para as infecções em fibroblastos WT, nossos resultados revelaram que parasitos provenientes de fibroblastos KOL2 foram menos infectivos em comparação àqueles provenientes de fibroblastos WT ou KOL1/L2. O número de células infectadas, bem como o número de parasitos intracelulares por 100 células, foi cerca de 61 e 65%, respectivamente, menor para as culturas de fibroblastos WT expostas a parasitos liberados de células KOL2 em relação às culturas expostas a parasitos provenientes de células WT. Adicionalmente, parasitos derivados de fibroblastos KOL1/L2 foram os mais infectivos, apresentando uma taxa de invasão significativamente maior em comparação às formas tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT ou KOL2 (Figura 6). Estes parasitos invadiram cerca de 74% e 50% mais células em relação às culturas expostas a parasitos provenientes de células KOL2 e WT, respectivamente, e observou-se cerca de 75% e 41% mais parasitos intracelulares por 100 células, em relação aos parasitos provenientes de células KOL2 e WT, respectivamente.

Para as infecções nas culturas de células epiteliais LLC-MK2, não foi observada diferença no perfil de invasão das formas tripomastigotas provenientes dos três tipos celulares. (Figura 7).

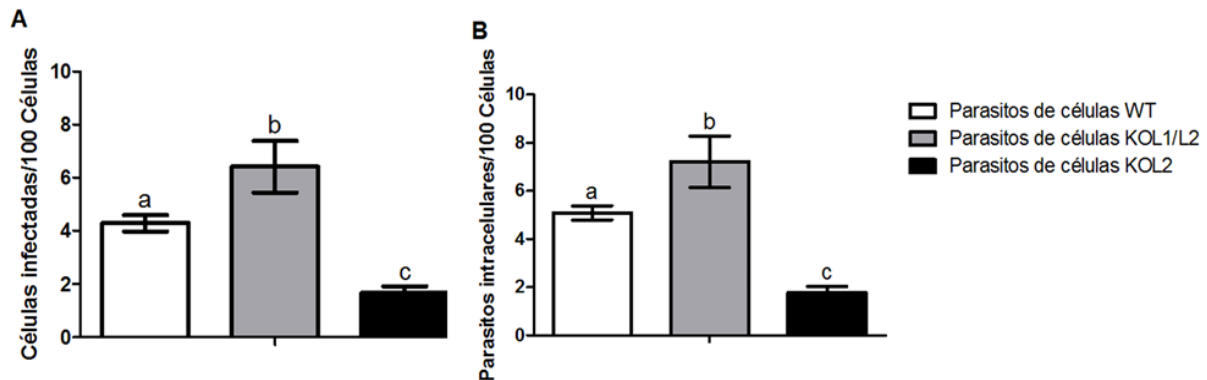


Figura 6. Ensaio de invasão com parasitos provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em células WT. Fibroblastos selvagens foram expostas a formas tripomastigotas de *T.cruzi*, provenientes dos mesmos fibroblastos selvagens, fibroblastos deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2, por 40min e fixados imediatamente após a exposição. (A) Número de células infectadas por 100 células totais e (B) número de parasitos intracelulares por 100 células, após a exposição aos parasitos. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0,05$, Teste T unicaudal não pareado).

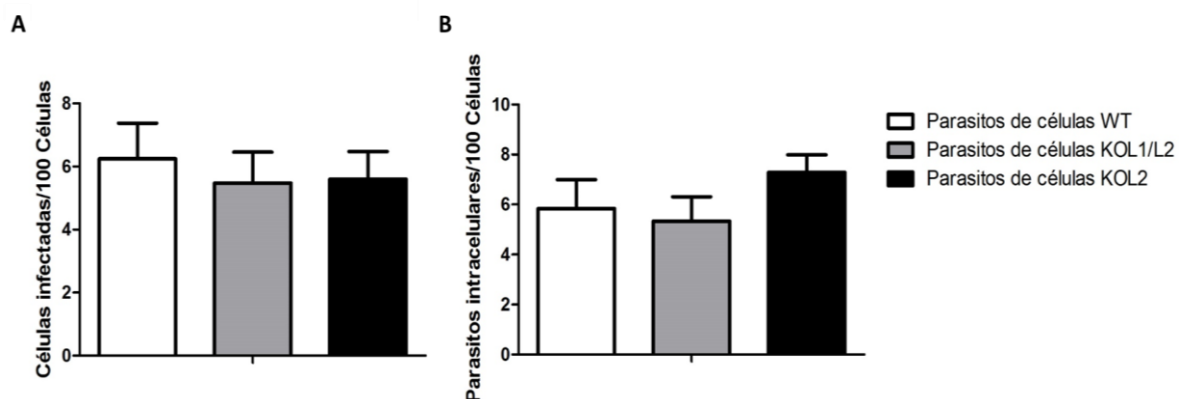


Figura 7. Ensaio de invasão com parasitos provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 em células LLC-MK2. Células epiteliais da linhagem LLC-MK2 foram expostas a formas tripomastigotas de *T.cruzi*, provenientes de fibroblastos selvagens, deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2, por 40min e fixadas imediatamente após a exposição. (A) Número de células infectadas por 100 células totais e (B) número de parasitos intracelulares por 100 células após a exposição aos parasitos. ($p > 0,05$, Teste T unicaudal não pareado).

5.2. Análise da taxa de adesão de tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2

Os ensaios de invasão com parasitos provenientes de células selvagens ou deficientes para LAMP, demonstraram haver diferenças no perfil de invasão desses parasitos. Procurando compreender se estas diferenças poderiam estar relacionadas com a capacidade de adesão do parasito à célula hospedeira, realizamos ensaios de adesão em fibroblastos WT e em células LLC-MK2 utilizando parasitos provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2.

Para estes ensaios, fibroblastos WT e células LLC-MK2 foram plaqueadas em placa de vinte e quatro poços, 24 h após o plaqueamento, as células foram pré-fixadas antes da exposição às formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, produzidas por cultura de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2, de acordo com protocolo descrito na metodologia.

Para os ensaios em fibroblastos WT, nossos resultados revelaram que parasitos provenientes de fibroblastos KOL1/L2 e de KOL2 possuem taxas mais baixas de adesão quando comparados com aqueles parasitos provenientes de fibroblastos WT (Figura 8). O número de parasitos aderidos por 100 células foi significativamente menor para as culturas de fibroblastos WT expostas aos parasitos liberados de células KOL1/L2 quando comparados a parasitos liberados de WT (cerca de 34,5%, ou parasitos liberados de KOL2 (cerca de 26%). Para as culturas expostas aos parasitos liberados de KOL2 em relação aos parasitos liberados de fibroblastos WT, não houve diferença estatisticamente significativa quanto à taxa de adesão. Dessa forma, não houve correlação direta entre as taxas de adesão e invasão do parasito.

Para as células LLC-MK2, nossos resultados revelaram que parasitos provenientes de fibroblastos KOL2 apresentam as taxas de adesão mais baixas quando comparadas com aqueles parasitos provenientes de fibroblastos WT e KOL1/L2 (Figura 9). O número de parasitos aderidos por 100 células foi cerca de 65% menor para as culturas de células LLC-MK2 expostas aos parasitos liberados de células KOL2, em relação às culturas expostas a parasitos provenientes de células KOL1/L2. Em relação aos demais grupos, não houve diferenças estatísticas na taxa de adesão dos parasitos. Novamente sugerindo que não há correlação entre as taxas de adesão e de invasão.

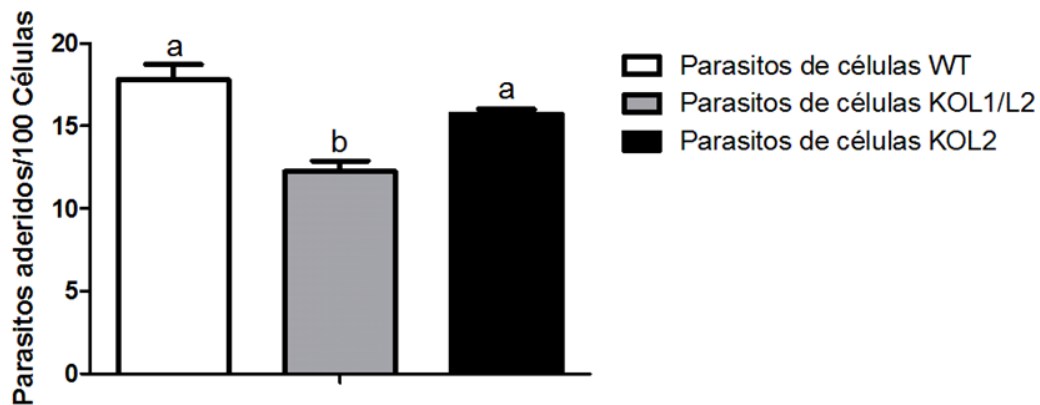


Figura 8. Ensaio de adesão em fibroblastos WT. Fibroblastos selvagens foram pré-fixados com 2% de glutaraldeído em PBS, antes da exposição à formas tripomastigotas de *T. cruzi*, provenientes dos mesmos fibroblastos selvagens, fibroblastos deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2, por 40 minutos (MOI 50). O gráfico apresenta o número de parasitos aderidos por 100 células totais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, Teste T unicaudal não pareado).

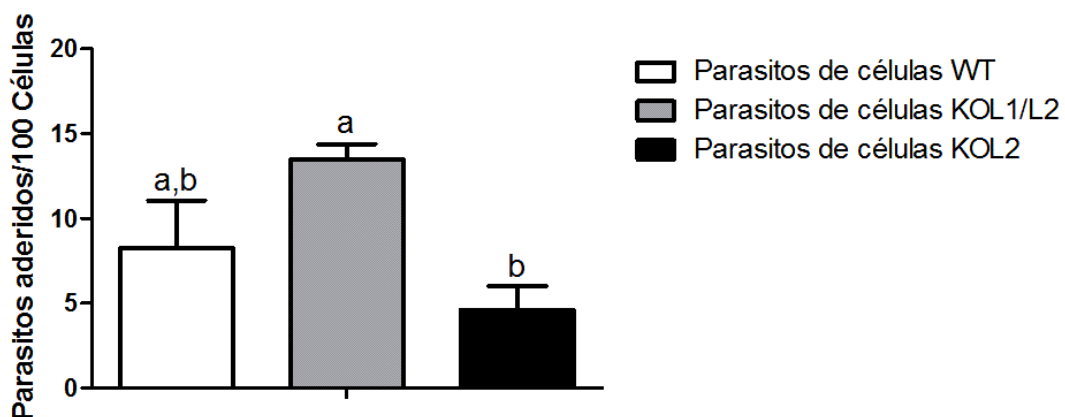


Figura 9. Ensaio de adesão em células LLC-MK2. Células epiteliais da linhagem LLC-MK2 foram pré-fixadas com 2% de glutaraldeído em PBS, antes da exposição à formas tripomastigotas de *T. cruzi*, provenientes de fibroblastos selvagens, fibroblastos deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2, por 40 minutos (MOI 50). O gráfico apresenta o número de parasitos aderidos por 100 células totais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, Teste T unicaudal não pareado).

5.3. Análise de microvesículas de tripomastigotas derivadas de células WT, KOL1/L2 e KOL2

Uma vez que diferenças tanto na taxa de invasão, quanto na taxa de adesão foram observadas para parasitos provenientes dos três tipos celulares, decidimos avaliar se havia indicativos de possíveis diferenças no perfil de expressão de proteínas de superfície destes parasitos. Para isto, avaliamos o padrão de microvesículas liberadas por parasitos provenientes dos três tipos celulares. As microvesículas são vesículas derivadas da membrana do parasito e podem ter como componentes moléculas que auxiliam na invasão do parasito (CESTARI et al., 2012). As microvesículas foram obtidas como descrito na metodologia e analisadas por ensaios de dessalinização/fracionamento, no NTA e LC-MS/MS.

Como observado na figura 10, os parasitos derivados dos diferentes tipos celulares apresentam um perfil de microvesículas distinto entre si. Essas diferenças nos tamanhos e nas concentrações de microvesículas apresentadas pelos parasitos poderiam justificar as diferenças vistas na invasão.

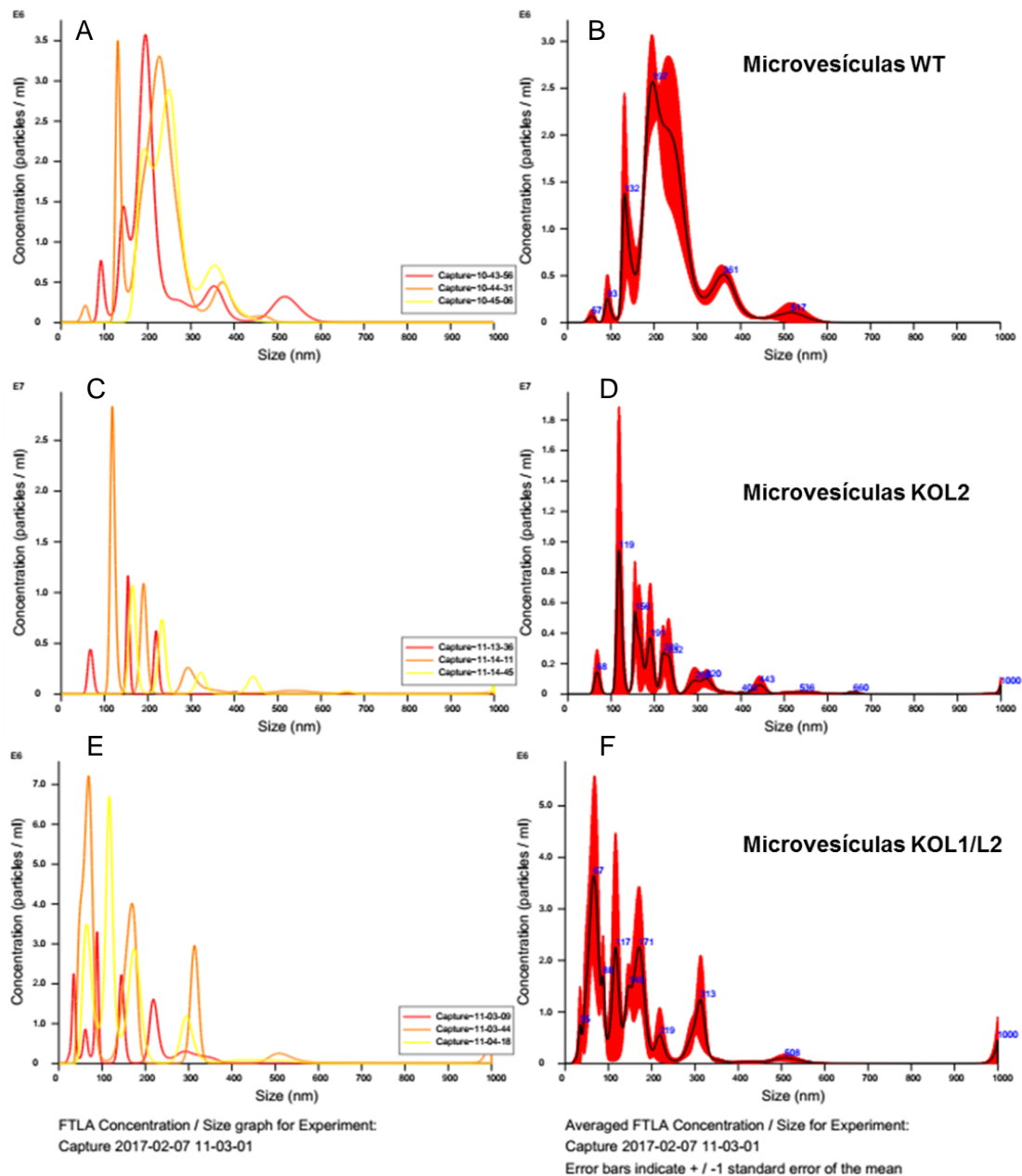


Figura 10. Perfil de microvesículas de tripomastigotas derivadas de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2. Os gráficos apresentam o perfil de vesículas (tamanho e concentração) liberadas por formas tripomastigotas de *T. cruzi* provenientes de fibroblastos selvagens, deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2. (A, C e E) Perfil de vesículas liberado por cada triplicata dos diferentes parasitos. (B, D, F) Média dos perfis de vesículas liberados pelos diferentes parasitos.

5.4. Análise de sinalização de cálcio induzida por tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 e de células LLC-MK2

A análise do perfil de invasão de parasitos provenientes de fibroblastos selvagens e deficientes para LAMP mostrou haver diferenças entre os parasitos liberados pelos diferentes tipos celulares. No entanto, as diferenças na taxa de invasão não foram compartilhadas por suas respectivas taxas de adesão nos dois tipos celulares estudados, WT e LLC-MK2. Por outro lado, observamos que o perfil de microvesículas liberadas pelos diferentes parasitos, obtidos a partir de fibroblastos selvagens, KOL1/L2 ou KOL2, também foi distinto indicando diferenças no perfil de proteínas de superfície do parasito. Como muitas dessas proteínas de superfície ou secretadas pelo parasito são importantes indutores do sinal de cálcio na célula hospedeira, resolvemos investigar se estas diferenças encontradas poderiam estar correlacionadas na sinalização de cálcio induzida por estes parasitos.

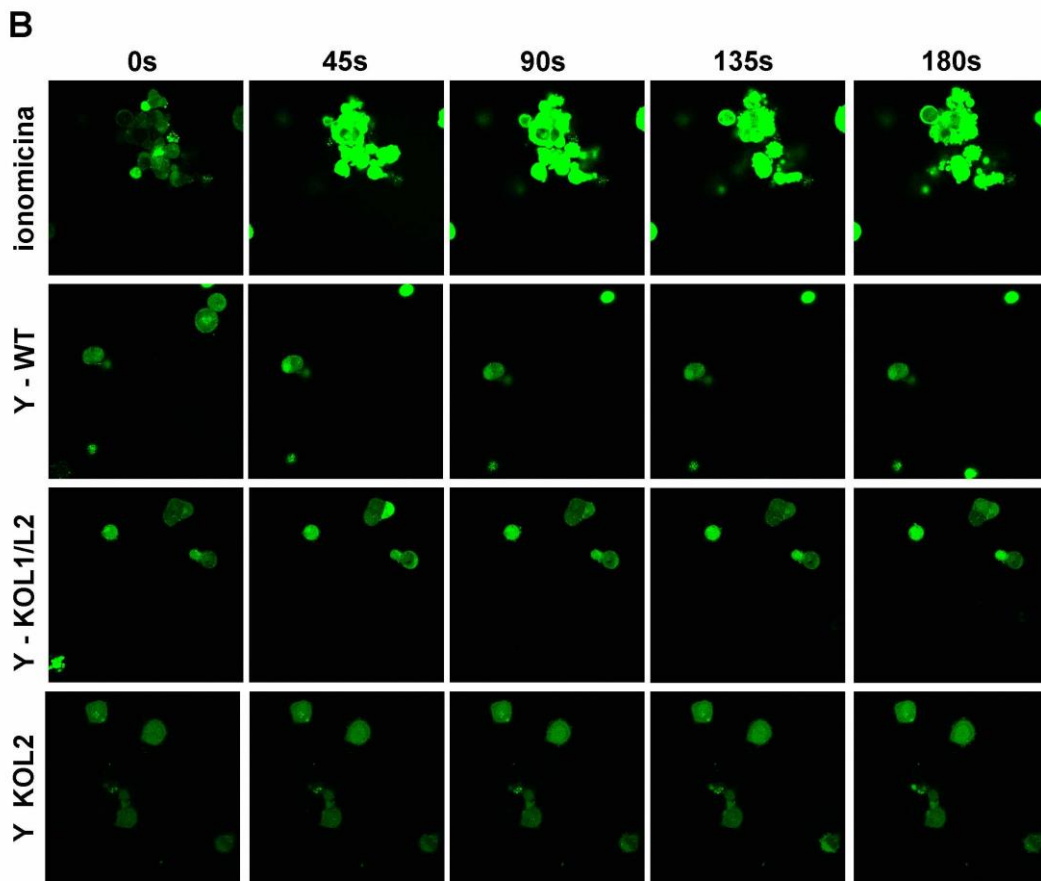
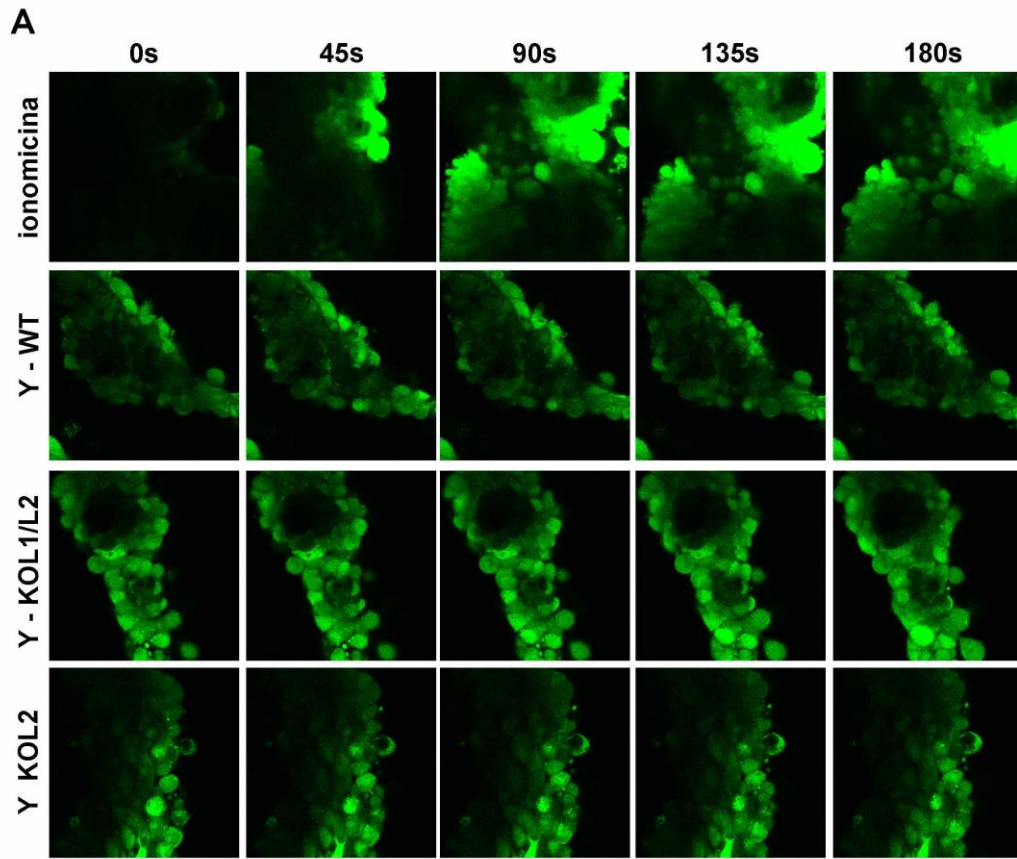
Para isso, células previamente carregadas com um sensor fluorescente de cálcio foram expostas às formas tripomastigotas de *T. cruzi* liberadas por fibroblastos WT, KOL1/L2 ou KOL2. Para os fibroblastos WT expostos aos parasitos oriundos de KOL1/L2 pudemos observar um aumento significativo na intensidade de fluorescência (aproximadamente 180 segundos), indicando aumento na concentração de cálcio livre no citoplasma (figura 11A). Para fibroblastos WT expostos aos parasitos oriundos também de fibroblastos WT, pudemos observar um pequeno sinal, enquanto para aqueles expostos a parasitos provenientes de KOL2 este sinal foi ainda menor. Como este foi um ensaio qualitativo, é possível que o sinal de cálcio gerado em células expostas aos parasitos liberados por fibroblastos WT e KOL2 não tenha sido suficiente para a visualização. De qualquer forma, estes resultados corroboram com uma maior invasão apresentada por parasitos oriundos de KOL1/L2, seguidos daqueles oriundos de WT e depois daqueles oriundos de KOL2.

O mesmo experimento foi realizado em células LLC-MK2 carregadas com o sensor de cálcio fluorescente. Para essas células um perfil parecido com o observado para fibroblastos WT, foi encontrado. No entanto, neste caso a diferença entre o sinal de cálcio entre células WT e KOL1/L2 foi menor do que aquele observado para os fibroblastos WT expostos a estes mesmos parasitos. Adicionalmente, para células LLC-MK2, embora muito menor, foi possível observar

um leve sinal de cálcio quando estas células foram expostas aos parasitos provenientes de células KOL2, o que não foi observado para os fibroblastos WT. Estes resultados mostram que em LLC-MK2 a diferença no perfil de indução de sinais de cálcio entre as cepas é menor do que aquele obtido para fibroblastos WT. Ensaio quantitativo deve ser realizado para confirmar estes dados.

11. Perfil de indução de sinal de cálcio em fibroblastos WT e células LLC-MK2 induzidas por tripomastigotas derivadas de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2.

Imagens seriadas obtidas em microscópio de fluorescência confocal, de fibroblastos WT (A) e células epiteliais LLC-MK2 (B) carregados com Fluo-4 / AM (sonda fluorescente sensora de cálcio), expostos à Ionomicina (ionóforo de cálcio - controle positivo) ou às formas tripomastigotas de parasitos provenientes de fibroblastos selvagens, deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2. Os painéis apresentam imagens obtidas de células antes (0h) e a cada 45 segundos após a exposição à Ionomicina ou aos diferentes parasitos. Aumentos na intensidade de fluorescência correspondem a aumento na concentração de cálcio livre no citoplasma. (*observar figura na próxima página*).



5.5. Análise da injúria celular causada por tripomastigotas provenientes de fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 e de células LLC-MK2

Sabe-se que, durante o processo de entrada na célula hospedeira, o parasito pode tanto estimular a liberação de cálcio de estoques intracelulares, através de suas proteínas de superfície ou liberadas para o meio extracelular, quanto levar ao influxo de cálcio do ambiente extra para o ambiente intracelular, através de microinjúrias causadas na superfície da célula hospedeira. Este aumento de cálcio leva à exocitose de lisossomos e consequente endocitose compensatória que carrega o parasito para o interior da célula. Com o intuito de verificar se havia diferenças na quantidade de microinjúrias causadas pelos parasitos obtidos dos diferentes tipos celulares, WT, KOL1/L2 ou KOL2, fibroblastos selvagens ou células LLC-MK2 foram plaqueados e 24hs depois colocados em contato com meio de cultura celular, meio contendo iodeto de propídeo ou meio contendo parasitos (MOI 100) e iodeto de propídeo por 30 min. Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas e analisadas por citometria de fluxo.

Como observado nas figuras 12 A e 13 A, parasitos liberados de células KOL1/L2 induziram níveis de injúria em fibroblastos WT cerca de 58% maior do que os parasitos derivados de WT e 51% maior do que os parasitos derivados de KOL2 em fibroblastos WT. Por outro lado, parasitos derivados de fibroblastos WT ou KOL2 apresentaram níveis de injúria cerca de 18% e 29%, respectivamente, maior do que o controle positivo somente com o iodeto de propídeo, indicando que causam lesões a poucas células.

Para as células LLC-MK2, parasitos derivados de células WT ou KOL2 apresentaram níveis de injúria tão baixos quanto o controle negativo, iodeto de propídeo, indicativo de que causam poucas lesões às células (Figuras 12 B e 13 B). Novamente, parasitos derivados de fibroblastos KOL1/L2 apresentaram níveis de injúria celular maiores em relação aos parasitos derivados de WT (cerca de 71%) e aqueles derivados de KOL2 (46%). No entanto, foi observado que para todos os tipos celulares os índices de fluorescência obtidos foram muito mais baixos para todos as condições quando comparado com os fibroblastos WT. Esses dados sugerem que as células LLC-MK2 são menos susceptíveis às microlesões do que os fibroblastos WT, uma vez que não só o número de células positivas para iodeto foi menor em todas as condições observadas, mas também na condição com

apenas iodeto de propídeo que representa a injúria normalmente sofrida pela célula durante o experimento.

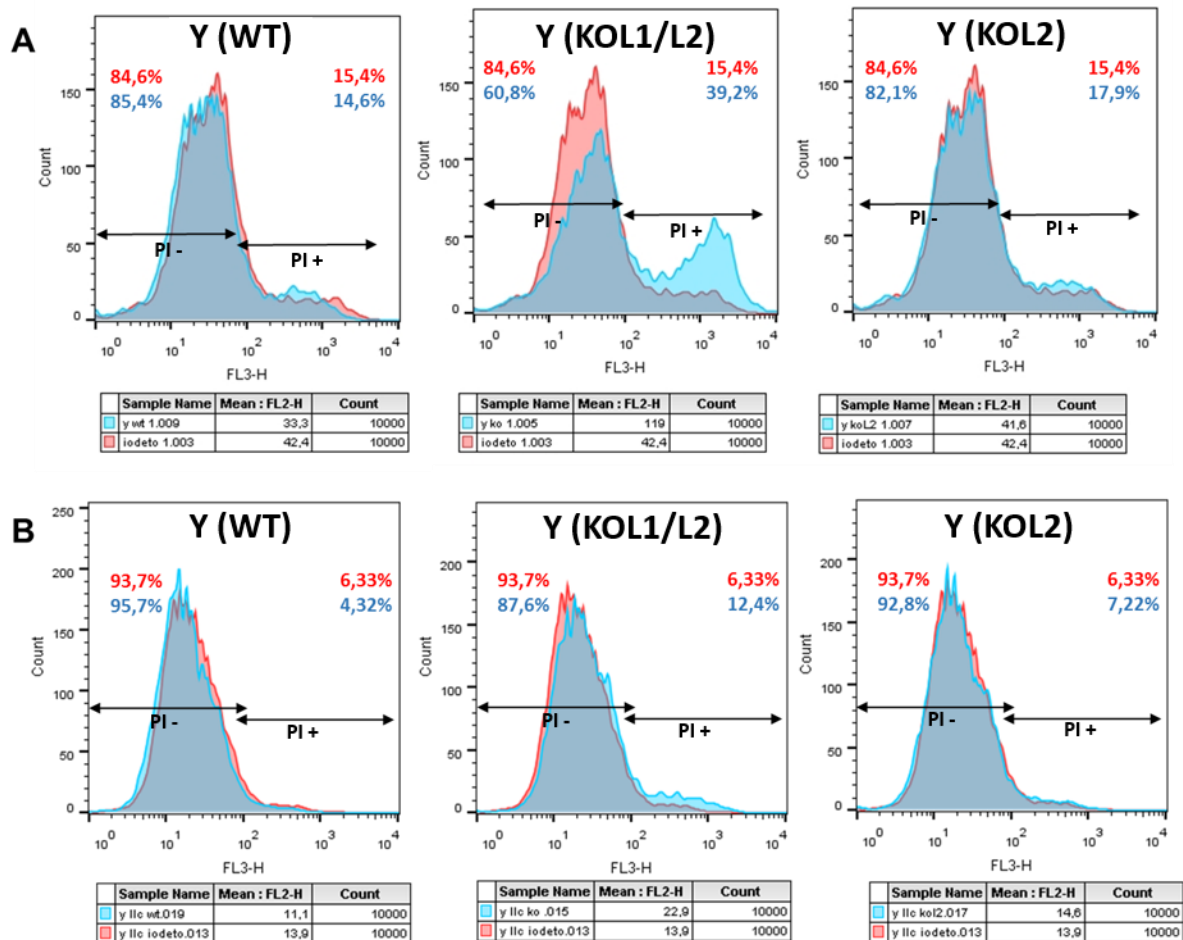


Figura 12. Ensaio de microinjúria em fibroblastos WT (A) e células epiteliais LLC-MK2 (B). Histogramas representativos mostrando o número de células por intensidade de fluorescência (IF). Células com IF superior a 10^2 foram consideradas positivas para marcação com o iodeto de propídeo (PI+), o qual corresponde ao número de células que sofreram injúria. Células com IF inferior a 10^2 foram consideradas negativas e, portanto, as que não sofreram injúria (PI-). As células foram plaqueadas e expostas somente ao iodeto de propídeo (vermelho) ou aos parasitos provenientes de fibroblastos selvagens, deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2 (azul), em meio contendo iodeto de propídeo, durante um período de 30 min. Posteriormente as células foram lavadas, tripsinizadas e analisadas em FACs Scan. Os números acima da curva representam a porcentagem de células PI- ou PI+ para cada condição: somente PI (vermelho) ou parasito mais PI (azul).

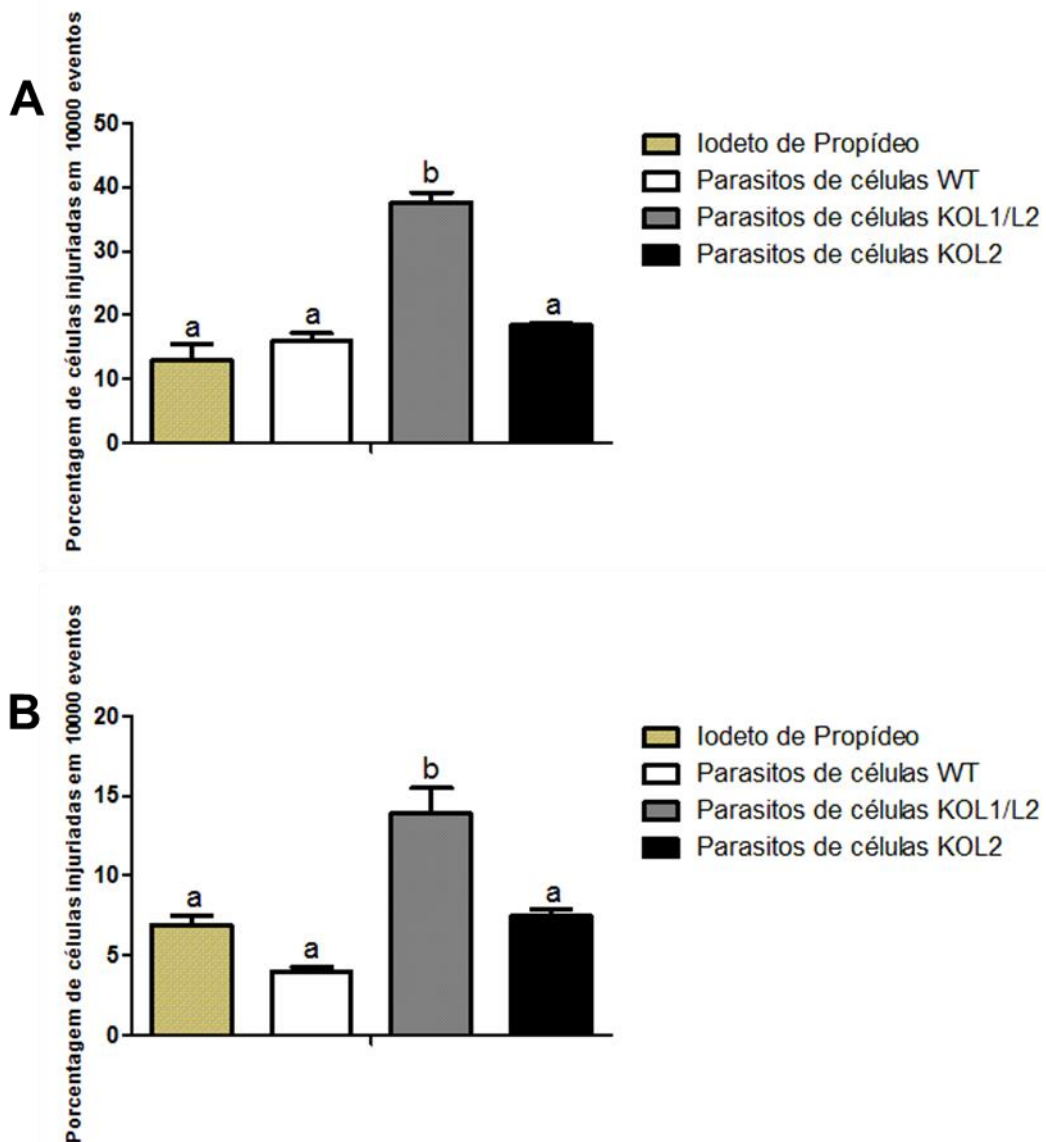


Figura 13. Ensaio de microinjúria em fibroblastos WT (A) e células epiteliais LLCMK2 (B). Os gráficos representam a análise quantitativa dos dados de triplicatas obtidas a partir do experimento apresentado na figura 12, mostrando a porcentagem de células que sofreram injúria em um total de 10.000 células. Como descrito na figura anterior, as células foram plaqueadas e expostas somente ao iodeto de propídeo ou aos parasitos provenientes de fibroblastos selvagens, deficientes em LAMP2 ou deficientes em ambas isoformas LAMP1 e 2, em meio contendo iodeto de propídeo, durante um período de 30 min. Posteriormente as células foram lavadas, tripsinizadas e analisadas em FACs Scan. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, Teste T unicaudal não pareado).

5.6. Análise do estresse oxidativo induzido pela infecção com *T. cruzi* em fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2

Com o intuito de avaliar possíveis diferenças no ambiente intracelular que pudessem contribuir para diferenças no perfil de proteínas de superfície do parasito, decidimos investigar se haveria uma diferença na indução de estresse oxidativo gerado pela infecção com os parasitos nos diferentes tipos celulares. Dados do laboratório (submetidos à publicação) mostram que o estresse oxidativo gerado durante a infecção em cardiomiócitos pode contribuir para a multiplicação intracelular do *T. cruzi* nestas células. Da mesma forma, GOES e colaboradores (2016) demonstraram que espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) contribuem para o crescimento do *T. cruzi* no interior de macrófagos. Uma vez que estudos anteriores do nosso grupo mostraram que o *T. cruzi* apresenta uma maior capacidade de multiplicação no interior das células deficientes para LAMP (PEDERSANE, 2014), nos propusemos investigar se o estresse oxidativo da célula induzido pela infecção poderia estar correlacionado com estas mudanças no perfil dos parasitos.

Para os ensaios de estresse oxidativo, fibroblastos WT, KOL1/L2 e KOL2 foram plaqueados em placas de vinte e quatro poços, após 24h as monocamadas foram expostas às formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* produzidas por culturas de células LLC-MK2 ou expostas ao meio de cultura sem parasitos. Aproximadamente 48h após a exposição aos parasitos ou ao meio somente, as células foram incubadas com a sonda CM-H₂DCFDA por 30 min a 37°C antes da leitura no aparelho Varioskan (Thermo Fisher).

Os resultados mostraram que não houve diferenças nos valores de oxidação da sonda CM-H₂DCFDA entre as células infectadas em relação às células não infectadas ou entre os diferentes tipos celulares (Figura 15). Este resultado nos indica que não houve indução de estresse oxidativo nestas células e que, provavelmente, este não seja um fator responsável pelas mudanças observadas no perfil dos parasitos.

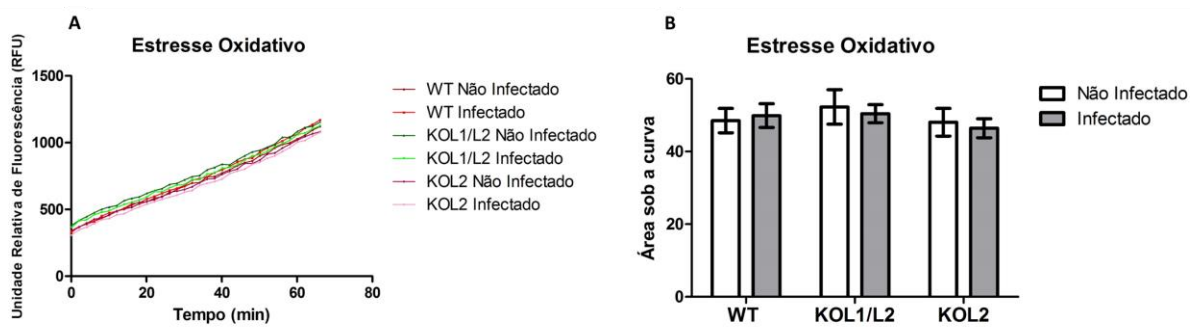


Figura 14. Ensaio de estresse oxidativo em fibroblastos infectados e não infectados.

Fibroblastos selvagens ou deficientes em LAMP foram incubados com a sonda CM-H₂DCFDA 48h pós infecção e a fluorescência emitida avaliada por Varioskan. A) O gráfico mostra os valores de fluorescência produzidos por oxidação da sonda CM-H₂DCFDA ao longo do tempo (68 minutos). Os dados representam a média de triplicatas. B) O gráfico representa a área sob a curva, mostrada em A. os dados representam a média de triplicatas do total de contagens em 68 min. não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. ($p > 0,05$, Teste T unicaudal não pareado).

5.7. Avaliação do recrutamento de +TIPs para o local de invasão do parasito e obtenção de células *knock outs* para essas proteínas a partir de CRISPR-Cas9

Uma vez que não identificamos a indução de estresse oxidativo, decidimos investigar outros parâmetros do ambiente intracelular que pudessem estar influenciando nas alterações de perfil encontradas nestes parasitos. A fusão de lisossomos durante as etapas iniciais da entrada, tanto para desencadear a endocitose compensatória, quanto posteriormente após a internalização do parasito são etapas cruciais para a viabilidade da infecção (ANDRADE; ANDREWS, 2004; FERNANDES et al., 2011). Tanto o tempo de permanência no vacúolo quanto a quantidade de lisossomos que se fundem a este vacúolo podem ser fatores que influenciam o ambiente intracelular pelo qual o parasito é exposto. Recentemente, foi demonstrado que proteínas envolvidas no metabolismo de microtúbulos, proteínas +TIP, são importantes para a entrada, fusão de lisossomos e mobilidade do vacúolo na célula (ZHAO et al, 2013). Os microtúbulos são responsáveis pelo suporte ao tráfego anterógrado (do núcleo para a periferia celular) de lisossomos dependente de cinesina, e retrógrado (da periferia celular para o núcleo), mediado pela dineína, de vesículas endocíticas recém-formadas (ZHAO et al, 2013; KORNILOVA, 2014). Dessa forma, decidimos investigar se a ausência de LAMP poderia estar envolvida com o recrutamento dessas proteínas e poderia alterar o tráfego intracelular do parasito ou a aquisição de lisossomos ao vacúolo. Para isso, iniciamos um processo de deleção via a técnica de CRISPR-Cas9, do gene que codifica a proteína CLASP-1 α , sabidamente envolvida com a entrada, aquisição de lisossomos e mobilidade do vacúolo na célula hospedeira.

Plasmídeos contendo o RNA *guide* desenhado para a CLASP1 α foram gerados como descrito na metodologia. A confirmação da inserção dos guias no plasmídeo foi realizada através de reação de PCR com o iniciador para o promotor do plasmídeo e também com iniciador reverso para a CLASP. O produto da reação foi separado por eletroforese (Figura 15). Os tamanhos de banda obtidos foram correspondentes ao tamanho da banda esperada, cerca de 300 pares de base (pb). Bactérias foram transformadas com os plasmídeos e após a obtenção dos clones, as células foram transfectadas. A partir dessas transfecções, foi possível selecionar clones possivelmente deficientes na proteína +TIP Clasp-1 α . Foram obtidos quatro clones em fibroblastos selvagens para LAMP, quatro clones em fibroblastos

deficientes em LAMP2 e dois clones em fibroblastos deficientes em LAMP1 e LAMP2. Os experimentos envolvendo essas células deficientes em CLASP1 não foram possíveis devido ao fim do prazo para a apresentação desta dissertação. A validação do nocauteamento da CLASP1 α nessas células está em processo.

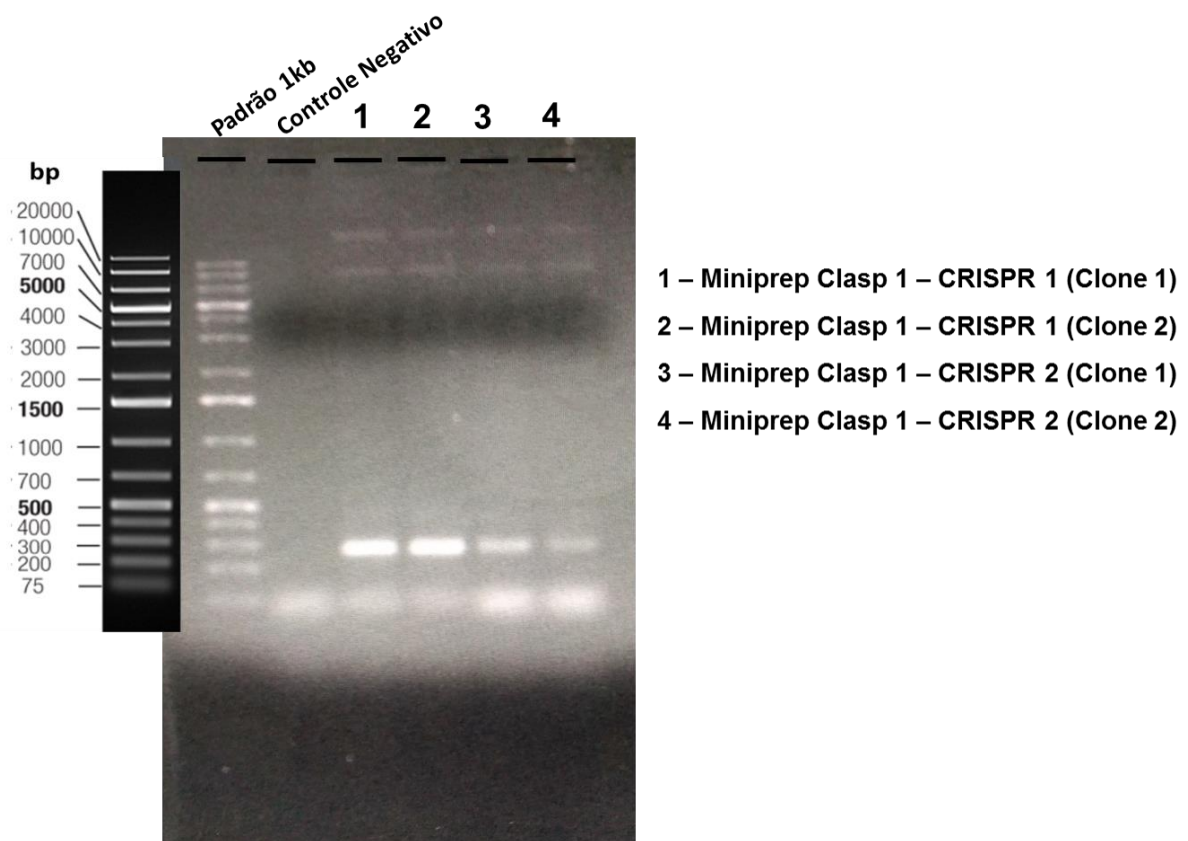


Figura 15. Eletroforese dos clones obtidos, em bactérias, do plasmídeo contendo CLASP1 α . No gel são observados o padrão de tamanho em pares de base (padrão 1Kb), o controle negativo da reação (sem DNA) e 4 clones obtidos das colônias de bactérias.

6 DISCUSSÃO

O parasito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, inicia seu ciclo intracelular invadindo a célula hospedeira, processo que envolve a adesão e o reconhecimento da forma infectiva do parasito pela célula e a indução de vias de sinalização que culminam com a internalização do parasito em um vacúolo endocítico, denominado vacúolo parasitóforo (revisado por ANDRADE; ANDREWS, 2005; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). A identificação de moléculas do *T. cruzi* que estão envolvidas nos estágios iniciais do processo de invasão, como a sinalização e a adesão à célula hospedeira, foram importantes avanços para a compreensão da infecção pelo *T. cruzi* (revisado por EPTING; COATES; ENGMAN, 2010). Tanto a adesão como a invasão são processos dependentes da interação entre proteínas de superfície do parasito e da célula hospedeira, algumas dessas proteínas desencadeiam vias de transdução de sinalização que levam ao aumento da concentração de cálcio citosólico em ambos parasito e célula hospedeira, além do recrutamento e fusão de lisossomos perinucleares da célula hospedeira no local de entrada do parasito (MORENO; DOCAMPO, 2003; YOSHIDA et al., 2000). Outras auxiliam na interação a partir da modificação de outras proteínas, como por exemplo as proteínas da família de *trans*-sialidases do *T. cruzi* (Tc-MUC) que transferem o ácido siálico das proteínas de superfície da célula para as proteínas de superfície da família MASP (*mucin-associated surface protein*) do parasito (ACOSTA-SERRANO et al., 2001), importantes para promover a entrada e a permanência dos parasitos nas células. Além das moléculas de superfície, organelas celulares, como os lisossomos, também impactam no sucesso de invasão pelo parasito. Como já descrito por ANDREWS (2002), os lisossomos são recrutados para o local de entrada do parasito via sinalização de cálcio e são cruciais para a permanência do parasito na célula.

Nosso grupo observou que parasitos da cepa Y de *T. cruzi* possuem dificuldade em invadir fibroblastos murinos (MEFs) deficientes nas proteínas lisossomais LAMP 1 e/ou LAMP 2, quando comparados à invasão em fibroblastos selvagens (COUTO et al, 2017). Essas proteínas são as principais glicoproteínas dos lisossomos e são importantes para a manutenção de sua integridade, pH e catabolismo (ANDREJEWSKI et al., 1999; ESKELINEN, 2006). Apesar de ter um

menor sucesso na invasão de células deficientes em LAMP, os parasitos apresentam uma capacidade consideravelmente maior em se replicarem no interior dessas células (PEDERSANE, 2014).

O *T. cruzi* possui a habilidade de infectar uma grande variedade de espécies, cerca de 1000 espécies de vertebrados e 40 espécies de invertebrados (TEIXEIRA et al., 2009). Toda essa capacidade, em parte, se deve a sua habilidade em se adaptar aos diferentes ambientes, seja mudando expressão de proteínas ou se transformando em uma de suas formas (epimastigota, tripomastigota ou amastigota). Essa adaptação ao ambiente celular foi observada por DOS SANTOS et al. (2012) em relação ao perfil de expressão das proteínas MASP. Dos Santos e colaboradores (2012) observaram que os parasitos cultivados em células da linhagem celular LLC-MK2 apresentavam um perfil de expressão de MASPs diferente daqueles parasitos cultivados em células da linhagem L6, mioblastos de rato, após alguns ciclos de infecção. Além disso, os autores também observaram que após vários ciclos de infecção em uma linhagem celular, os parasitos apresentavam uma menor taxa de invasão em outro tipo celular.

Diante dessas informações, nos perguntamos se os parasitos liberados de fibroblastos deficientes em proteínas LAMP-1 e LAMP-2 (KOL1/L2) ou somente em LAMP-2 (KOL2) sofreram pressões suficientes para estimular adaptações. Para isso nos propusemos a fazer um ciclo de infecção em fibroblastos deficientes ou selvagens para LAMP e os parasitos liberados desse ciclo eram desafiados a invadir fibroblastos selvagens ou células da linhagem LLC-MK2. Nossos resultados revelaram padrões de infecção diferentes para os tipos celulares bem como também para os três grupos de parasitos. Nós observamos que aqueles parasitos liberados de células KOL1/L2 eram mais infectivos se comparados aqueles parasitos liberados de células selvagens para LAMP (WT) e os parasitos liberados de células KOL2 eram menos infectivos frente ao desafio com células WT. No entanto, para o desafio com células LLC-MK2, não observamos diferenças entre os parasitos. Isso demonstra que o ambiente intracelular é importante e capaz de induzir alterações na formação de novas formas infectantes do parasito. Adicionalmente, que essas alterações podem ser percebidas de forma diferente para os diferentes tipos celulares. Isso concorda com o modelo, anteriormente proposto, e resultados sobre histotropismo diferencial de distintas cepas do parasito (ANDRADE et al., 1999; MACEDO et al., 2004). No intuito de compreender melhor e caracterizar os

parasitos, ensaios de adesão, microvesículas, sinalização de cálcio, injúria celular e estresse oxidativo também foram realizados.

Nossos ensaios de adesão revelaram não haver uma correlação direta entre a adesão do parasito e a sua internalização. Para os ensaios com fibroblastos WT, observamos que parasitos provenientes de fibroblastos KOL1/L2 aderem menos do que parasitos provenientes de fibroblastos WT ou KOL2. No entanto, para as células LLC-MK2 observamos que parasitos provenientes de fibroblastos KOL2 aderem menos quando comparados a parasitos provenientes de fibroblastos KOL1/L2, porém não há diferença quando comparados a parasitos provenientes de fibroblastos WT, novamente demonstrando que não há correlação entre a taxa de invasão e a taxa de adesão desses parasitos. Estes dados são bastante interessantes, uma vez que é assumido na literatura que uma maior adesão é certamente importante e contribui diretamente para uma maior invasão. Nossos dados mostram que, pelo menos neste contexto, de presença e ausência de LAMP, maior adesão, não necessariamente significa maior invasão, assim como o oposto é verdade. Estes dados suportam ainda a ideia de que as proteínas envolvidas em adesão podem diferir daquelas necessárias para a sinalização e desencadeamento do processo de invasão celular.

GONÇALVES e colaboradores, em 1991, demonstraram pela primeira vez que tripomastigostas liberavam vesículas de tamanho em torno de 20-80nm ao longo de sua superfície. Posteriormente, mostrou-se que o principal componente dessas vesículas, após purificação e separação por tamanho, eram membros da superfamília TS/gp85 (TRIBULATTI et al., 2005). Outros autores também demonstraram a existência de moléculas contendo α -Gal (ACOSTA-SERRANO et al., 2001; ALMEIDA et al., 1994), proteases como cruzipaina (APARICIO; SCHARFSTEIN; LIMA, 2004), proteínas do citoesqueleto, proteínas da família MASP e várias outras proteínas com funções ainda desconhecidas (revisado por CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Na literatura, tem-se uma extensiva documentação de moléculas de superfície do parasito que interagem com a célula hospedeira e que são importantes para sua internalização. Diante das diferenças observadas em nossos ensaios de invasão e adesão, com parasitos provenientes de fibroblastos selvagens ou deficientes em LAMP, nos indagamos se tais diferenças poderiam estar correlacionadas com a mudança de moléculas expostas na superfície do parasito e conseqüentemente nas microvesículas

liberadas. Embora, não tenhamos analisado o conteúdo das microvesículas liberadas por esses parasitos, observamos que o perfil de microvesículas liberadas por eles difere em relação ao tamanho e concentração. Acreditamos que esse seja um indício de que os parasitos estão sendo induzidos a mudanças em suas moléculas de superfície, como forma de adaptação ao ambiente intracelular. Dos Santos e colaboradores em 2012, demonstraram que o parasito é induzido a modificar a expressão de membros da família MASP ao longo de sucessivos ciclos de infecção e que esta mudança impacta na interação dos parasitos com outros tipos celulares. Neste trabalho, realizamos alguns ensaios tentando identificar alguns membros de MASPs diferencialmente expressos nestes parasitos provenientes dos três tipos celulares. No entanto, uma vez que os iniciadores para amplificação de genes de MASP, disponíveis para estes ensaios, haviam sido desenhados para outra cepa, não obtivemos um bom resultado. Isto também corrobora a diversidade de expressão dessas proteínas e seu possível papel contribuindo para um perfil diferencial de infecção celular. Para confirmação de diferenças no perfil de expressão destas e outras proteínas importantes para a invasão do parasito, análises proteômicas dessas microvesículas e de proteínas de superfície do parasito serão realizadas.

Diferenças na superfície do parasito, podem certamente acarretar mudanças no seu perfil de estimulação da célula hospedeira, interferindo com diferentes etapas do processo de entrada. Dentre estes, a indução de sinais de cálcio, seja ele por estimulação de receptores na superfície celular e liberação de estoques intracelulares ou através de influxo de cálcio extracelular, ocasionado por microinjúrias provocadas pelos parasitos. Percebemos que parasitos provenientes de células KOL1/L2 induzem os maiores sinais de cálcio em fibroblastos WT, corroborando sua maior capacidade de invasão nessas células. Por outro lado, embora parasitos oriundos de fibroblastos WT tenham apresentado um sinal de cálcio qualitativamente menor que aqueles oriundos de KOL1/L2, este sinal foi aparentemente maior do que aquele obtido para KOL2. Esses dados corroboram os dados de invasão celular obtidos para fibroblastos WT. Adicionalmente, em ensaios de microinjúria usando iodeto de propídeo, os parasitos oriundos de fibroblastos KOL1/L2 foram também capazes de induzir maior injúria, indicando que pelo menos em parte esta capacidade maior de injúria possa estar relacionada a um maior influxo de cálcio. De fato, parasitos liberados de fibroblastos WT ou KOL2

desencadearam sinais de cálcio menores na célula hospedeira, e apresentaram também níveis de injúria similares. Para esses parasitos (WT e KOL2) não houve congruência direta entre os níveis de cálcio e de injúria. Isto pode estar relacionado à sensibilidade dos métodos estudados. Outra possibilidade é que não só a injúria, mas alterações no sinal de cálcio induzidas por fatores secretados pelo parasito sejam responsáveis por essas diferenças. Para células LLC-MK2 os níveis de indução de cálcio e de injúria realizados, embora maiores para parasitos oriundos de fibroblastos KOL1/L2, foram menores em todos os casos do que aqueles observados para fibroblastos WT, o que poderia justificar a pouca diferença nos níveis de invasão entre parasitos oriundos dos diferentes tipos celulares. Adicionalmente, para células LLC-MK2 não houve total congruência entre os níveis de cálcio e de injúria, reforçando que outros fatores podem também estar contribuindo para a indução dos níveis de cálcio que não só a injúria. Como mencionado, no caso de LLC-MK2, nossos dados revelaram que estas células aparentemente são mais resistentes a injúria do que fibroblastos WT pois, apresentaram menores quantidades de células injuriadas inclusive no controle positivo. Alterações nos níveis de injúria celular para diferentes tipos celulares já haviam sido descritas anteriormente (COUTO et al., 2017). Utilizando células também deficientes ou não em LAMP e que apresentam diferenças na organização de seu citoesqueleto, esses autores mostraram que o montante de injúria causada por formas tripomastigotas de *T. cruzi* pode variar dependendo do estado de organização do citoesqueleto de actina da célula. Isso poderia justificar as diferenças observadas entre os dois tipos celulares utilizados no presente estudo.

Com o intuito de entender o que no ambiente intracelular poderia estar contribuindo para diferenças no perfil de expressão de proteínas nestes parasitos, realizamos ensaios de avaliação da indução de estresse oxidativo durante a infecção em fibroblastos das diferentes linhagens (WT, KOL1/2 e KOL2). Em estudos anteriores, nosso laboratório já havia demonstrado que embora os parasitos tenham uma capacidade menor de invadir fibroblastos deficientes em LAMP, apresentam uma capacidade de multiplicação em seu interior muito maior do que em fibroblastos selvagens (PEDERSANE, 2014). Tal característica poderia estar correlacionada com o estresse oxidativo gerado nestas células pela infecção com o *T. cruzi*. GOES e colaboradores (2016) demonstraram que espécies reativas de oxigênio contribuem para o crescimento do *T. cruzi* no interior de macrófagos e

DIAS (2017) estudando a cepa JG e o clone de Colombiana Col1.7G2, observou a correlação de um maior estresse oxidativo em cardiomiócitos primários e o crescimento da cepa JG. Poderia a infecção celular pelo *T. cruzi* estar induzindo estresse oxidativo nos fibroblastos deficientes em LAMP e consequentemente induzindo uma melhor multiplicação do parasito em seu interior? Para elucidar esta questão, infectamos os fibroblastos selvagens ou deficientes em LAMP e, 48h após a infecção, incubamos com a sonda CM-H₂DCFDA e analisamos no Varioskan. Os ensaios revelaram não haver diferenças em relação a produção de ROS em fibroblastos não infectados ou infectados, revelando que estas células não sofrem estresse oxidativo mediante infecção pelo *T. cruzi*. Também não foram observadas diferenças entre os fibroblastos selvagens e deficientes. Dessa forma, o estresse oxidativo parece não ser o fator responsável por esta diferença.

Nossos resultados sugerem que o ambiente intracelular deficiente em LAMP induz modificações no parasito de modo a alterar suas características infectivas e de adesão. Inúmeras podem ser as explicações para tais alterações. Dados da literatura já demonstraram que existem várias moléculas de superfície do parasito que são responsáveis por interagir com a célula e desencadear sinalizações que culminam na entrada do parasito (CAMPO; MARTINS-TEIXEIRA; CARVALHO, 2016) e que mudanças em sua expressão podem ocorrer (DOS SANTOS et al., 2012). Além disso, outros fatores como a motilidade do parasito também pode interferir com sua capacidade de invasão. MATTOS (2013) mostrou que a interação do parasito com componentes da matriz celular, como fibronectina e laminina, induzem modificações na fosforilação/desfosforilação de proteínas relacionadas ao citoesqueleto e ao flagelo do parasito podendo impactar em sua motilidade e consequentemente na invasão. Segundo o autor, uma redução na polia glutinação de tubulina também afeta a estabilidade do flagelo, podendo impactar diretamente na adesão ou invasão do parasito. Outro fator seria a secreção de componentes capazes de induzir a formação de pequenos canais na membrana, como seria o caso da Tc-TOX, uma proteína do parasito envolvida com o rompimento da membrana do vacúolo parasitóforo (ANDREWS et al, 1990).

Não só o ambiente citosólico, mas os ambientes percorridos durante tráfego intracelular do parasito, incluindo o montante de lisossomos que se fundem ao vacúolo parasitóforo, conteúdo ácido ou tempo de permanência no vacúolo também poderiam estar contribuindo para diferenças no ambiente intracelular que

poderiam induzir modificações no perfil de expressão destes parasitos. Sabemos que a fusão de novos lisossomos ao vacúolo parasitóforo é uma etapa crucial para a viabilidade da infecção uma vez que, sem esta fusão os parasitos podem escapar da célula hospedeira (ANDRADE; ANDREWS, 2004). Essa etapa é também dependente da dinâmica de microtúbulos da célula hospedeira. Os microtúbulos são responsáveis pelo suporte ao tráfego anterógrado (do núcleo para a periferia celular) de lisossomos dependente de cinesina, que é necessário para o remodelamento da membrana plasmática e para a invasão do parasito (ZHAO et al., 2013). Além disso, os microtúbulos são também responsáveis pelo transporte retrógrado (da periferia celular para o núcleo), mediado pela dineína, de vesículas endocíticas recém-formadas (KORNILOVA, 2014). Neste contexto, proteínas estabilizadoras da extremidade mais (*plus-end*) de microtúbulos, denominadas de +TIPs (*microtubule plus-end tracking protein*) também poderiam estar envolvidas na coordenação da internalização de tripomastigotas e em eventos pós-entrada do parasito. De fato, o trabalho de ZHAO e colaboradores (2013) demonstrou que o silenciamento da proteína CLASP-1, uma +TIP que participa da estabilização do microtúbulo, impactando na formação do fuso mitótico (MIMORI-KIYOSUE et al., 2005) e processos dinâmicos na periferia da célula (AKHMANOVA et al., 2001; MIMORI-KIYOSUE et al., 2005), diminui a internalização de tripomastigotas sem alterar a exocitose de lisossomos regulada por cálcio. O trabalho mostrou que a fusão subsequente do vacúolo parasitóforo com os lisossomos da célula hospedeira bem como seu posicionamento justanuclear sofrem um atraso em células CLASP1 depletadas. Por outro lado, o silenciamento de EB1, um componente importante das +TIPs que auxilia na ligação de outras +TIPs, incluindo CLASP-1, na extremidade mais (*plus-end*) do microtúbulo, não afetou a entrada do *T. cruzi* na célula e também não impacta na acumulação de LAMP-1 no vacúolo parasitóforo (ZHAO et al., 2013). Um dos nossos objetivos específicos nesse trabalho era avaliar o papel de LAMP no recrutamento das proteínas CLASP-1, CLASP-2 e EB-3, bem como avaliar o impacto da ausência dessas proteínas, na infecção pelo *T. cruzi*, mediante a geração de células *knock out* através da técnica de edição gênica CRISPR-Cas9. Obtivemos sucesso na geração de clones possivelmente deficientes para a proteína CLASP-1, no entanto devido ao esgotamento do tempo, não foi possível dar prosseguimento às análises e experimentos. Ensaio de recrutamento de +TIPs também foram realizados porém, não foi possível avaliar com sucesso se ocorre ou

não o recrutamento dessas proteínas para o local de entrada do parasito, uma vez que a taxa de transfecção das células com os plasmídeos contendo os genes das proteínas +TIPs ligadas ao GFP era muito baixa. A taxa de infecção dessas células pelos parasitos também é baixa e por este motivo, era raro encontrar uma célula transfectada expressando a +TIP que também estivesse infectada. Essas limitações inviabilizaram o sucesso dos experimentos

Os dados aqui apresentados confirmam dados anteriores da literatura de que o ambiente intracelular modula o perfil de expressão de parasitos liberados por estas células. Adicionalmente, estas alterações de perfil têm impacto significativo na sua capacidade de infecção de novas células. Mais importante, demonstramos que uma proteína lisossomal, LAMP, tem impacto importante neste processo. Novos estudos devem ser realizados para identificar as diferenças no perfil destes parasitos, bem como os fatores do ambiente intracelular envolvidos neste processo.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-SERRANO, A. et al. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: Structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 2001.
- ADESSE, D. et al. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 5, p. 846–854, 2010.
- AKHMANOVA, A. et al. CLASPs are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. **Cell**, 2001.
- ALBERTTI, L. A. G. et al. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 10, p. 784–789, 2010.
- ALMEIDA, I. C. et al. GPI-anchored glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes are recognized by lytic anti-alpha-galactosyl antibodies isolated from patients with chronic Chagas' disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 2, p. 443–447, 1994.
- ANDRADE, L. O. et al. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 163–172, 1999.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. **The Journal of Experimental Medicine J. Exp. Med**, v. 11900, n. 9, p. 1135–1143, 2004.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–823, 2005.
- ANDREJEWSKI, N. et al. Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 18, p. 12692–12701, 1999.
- ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 474–484, 1987.
- ANDREWS, N. W. et al. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, 1990.
- ANDREWS, N. W. Lysosomes and the plasma membrane: Trypanosomes reveal a secret relationship. **Journal of Cell Biology**, 2002.

- ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 249–256, 1989
- APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5892–5902, 2004.
- ARGOLO, A. M. et al. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. **Doença de Chagas e seus ...**, p. 63, 2008.
- BALOUZ, V. et al. Mapping antigenic motifs in the trypomastigote small surface antigen from *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 3, p. 304–312, 2015.
- BARBOSA, H. S.; DE MEIRELLES, M. DE N. Ultrastructural detection in vitro of WGA-, RCA I-, and Con A-binding sites involved in the invasion of heart muscle cells by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 78, n. 5, p. 404–409, 1992.
- BAYER-SANTOS, E. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 2, p. 883–897, 2013.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol** 27: 347-382, 1973
- BURLEIGH, B. A. et al. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 609–620, 1997.
- BUSTAMANTE, J.; TARLETON, R. Reaching for the holy grail: Insights from infection/cure models on the prospects for vaccines for *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 445–451, 2015.
- CALER, E. V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v. 17, n. 17, p. 4975–4986, 1998.
- CALER, E. V. et al. Dual role of signaling pathways leading to Ca²⁺ and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6602–6610, 2000.
- CÁNEPA, G. E. et al. Involvement of TSSA (trypomastigote small surface antigen) in *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Biochemical Journal**, v. 444, n. 2, p. 211–218, 2012.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, 2016.
- CAZORLA, S. I. et al. Oral multicomponent DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella* elicited immunoprotection against American trypanosomiasis. **Journal of**

Infectious Diseases, v. 211, n. 5, p. 698–707, 2015.

CESTARI, I. et al. *Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1942–1952, 2012.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHEN, J. W. et al. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. **The Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 1, p. 85–95, 1985.

CIAVAGLIA MDO, C.; DE CARVALHO, T. U.; DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 193, n. 2, p. 718–721, 1993.

CORROTTE, M. et al. Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. **eLife**, v. 2013, n. 2, 2013.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, 2010.

DA SILVEIRA, J. F.; ABRAHAMSOHN, P. A.; COLLI, W. Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 550, n. 2, p. 222–32, 1979.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, 2010.

DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. **Infection and immunity**, n. March, 19 mar. 2012.

DI NOIA, J. M. et al. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 4, p. 401–413, 2002.

DIAS, P. P. Influência do tráfego intracelular do *Trypanosoma cruzi* e resposta celular à infecção no desenvolvimento intracelular do parasito. 2017. 101f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DORTA, M. L. et al. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Molecular**

and Biochemical Parasitology, v. 73, n. 1–2, p. 285–289, 1995.

DOS SANTOS, S. L. et al. The MASP Family of *Trypanosoma cruzi*: Changes in Gene Expression and Antigenic Profile during the Acute Phase of Experimental Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

EGIMA, C. M. et al. Organization of trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 115–125, 1996.

EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283–291, 2010.

ESKELINEN et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 3355–3368, 2002.

ESKELINEN, E. L. et al. Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 3132–3145, 2004.

ESKELINEN, E. L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Molecular Aspects of Medicine**, 2006.

ESKELINEN, E. L.; TANAKA, Y.; SAFTIG, P. At the acidic edge: Emerging functions for lysosomal membrane proteins. **Trends in Cell Biology**, 2003.

FERNANDES, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–21, 2011.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: A unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, 2012.

FUKUDA, M. Lysosomal Membrane Glycoproteins Structure, Biosynthesis, And Intracellular Trafficking. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 32, p. 21327–21330, 1991.

GOES, G. R. et al. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

GONÇALVES, M. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: Shedding of surface antigens as membrane vesicles. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 43–53, 1991.

GUPTA, S.; GARG, N. J. A Two-Component DNA-Prime/Protein-Boost Vaccination Strategy for Eliciting Long-Term, Protective T Cell Immunity against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 5, 2015.

HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 115, n. 11, p. 903–

918, 1962.

HUYNH, K. K. et al. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. **The EMBO Journal**, v. 26, p. 313–324, 2007.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, p. e29, 2010.

KORNFELD, S.; MELLMAN, I. The Biogenesis of Lysosomes. **Annual Review of Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 483–525, 1989.

KORNILOVA, E. S. Receptor-mediated endocytosis and cytoskeleton. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 79, n. 9, p. 865–78, 2014.

MACEDO, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2004.

MANTEL, P. Y.; MARTI, M. The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. **Cellular microbiology**, v. 16, n. 3, p. 344–54, 2014.

MARCILLA, A. et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, 2014.

MARTINS, R. M. et al. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 943–954, 2011.

MATTEI, M. G. et al. Two human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2, are encoded by genes localized to chromosome 13q34 and chromosome Xq24-25, respectively. **Journal of Biological Chemistry**, 1990.

MATTOS, E. C. Interação Parasita-Célula hospedeira: Modificação de proteínas de *Trypanosoma cruzi* durante adesão à matriz extracelular. **Tese Apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo**, 2013.

MEIRELLES, M. N. L. et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 52, n. 2, p. 175–184, 1992.

MIMORI-KIYOSUE, Y. et al. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. **Journal of Cell Biology**, 2005.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Current Opinion in Microbiology**, 2003.

MURTA, A. C. M. et al. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. **Molecular and Biochemical**

Parasitology, v. 43, n. 1, p. 27–38, 1990.

ORTEGA-BARRIA, E. et al. The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidases, YWTD repeats of the low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. **J. Exp. Med.**, v. 174, n. 1, p. 179–191, 1991.

PAIVA, C. N. et al. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. **Parasitology**, v. 117 Pt 5, p. 483–490, 1998.

PEDERSANE, D. C. N. Estudo do papel diferencial de cada uma das isoformas da proteína lisossomal LAMP (LAMP-1 e LAMP-2) no processo de infecção celular pelo *Trypanosoma cruzi*. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RAMIREZ, M. I. et al. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3636–3641, 1993.

RAMIREZ, M. I. et al. Dynamic flux of microvesicles modulate parasite host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 4, 2017.

RODRÍGUEZ, A. et al. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1263–1273, 1995.

ROMANO, P. S. et al. Molecular and cellular mechanisms involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. **IUBMB Life**, 2012.

RUBIN-DE-CELIS, S. S. C. et al. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1888–1898, 2006.

RUIZ, R. C. et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **The Biochemical journal**, v. 330 Pt 1, p. 505–11, 1998.

SCHARFSTEIN, J. et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B (2) receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 9, p. 1289–1300, 2000.

SCHENKMAN, S. et al. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1117–1125, 1991.

SCHENKMAN, S. et al. Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of non-phagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, v.

175, n. June, p. 1635–1641, 1992.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 76–86, 1991.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

TAM, C. et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. **Journal of Cell Biology**, 2010.

TANAKA, Y. et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. **Nature**, v. 406, n. 6798, p. 902–906, 2000.

TARDIEUX, I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, 1992.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25 Suppl 1, p. S32-44, 2009.

TIMENETSKY, J. et al. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 907–914, 2006.

TORRECILHAS, A. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 1, p. 29–39, 2009.

TORRECILHAS, A. C. et al. Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1465–1474, 2012.

TRIBULATTI, M. V. et al. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 201–207, 2005.

TWU, O. et al. *Trichomonas vaginalis* Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host: Parasite Interactions. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 7, 2013.

TWU, O.; JOHNSON, P. J. Parasite Extracellular Vesicles: Mediators of Intercellular Communication. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, 2014.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, 2003.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2013.

WATANABE COSTA, R.; DA SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* secreted proteins and host cell signaling pathways. **Frontiers in**

Microbiology, 2016.

WESTON, D.; PATEL, B.; VAN VOORHIS, W. C. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 105–116, 1999.

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 13, p. 5022–5027, 2008.

YOSHIDA, N. et al. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 3, p. 269–278, 2000.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 1, 2006.

ZHAO, X. et al. Host microtubule plus-end binding protein CLASP1 influences sequential steps in the *Trypanosoma cruzi* infection process. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 571–584, 2013

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO Fact sheet, Updated March 2017 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>)