

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Dina Pedersane Nunes de Castro

**ESTUDO DO PAPEL DIFERENCIAL DE CADA UMA DAS ISOFORMAS DA  
PROTEÍNA LISSOMAL LAMP (LAMP-1E LAMP-2) NO PROCESSO DE  
INFECÇÃO CELULAR PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

Belo Horizonte  
2014

Dina Pedersane Nunes de Castro

**ESTUDO DO PAPEL DIFERENCIAL DE CADA UMA DAS ISOFORMAS DA  
PROTEÍNA LISSOMAL LAMP (LAMP-1E LAMP-2) NO PROCESSO DE  
INFECÇÃO CELULAR PELO *TRYPANOSOMA CRUZI***

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Belo Horizonte  
2014

*“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muito trabalho e persistência”.*  
Henry Ford

## DEDICATÓRIA

*“O mais difícil não é escrever muito: é dizer tudo, escrevendo pouco”.*

Júlio Dantas

Dedico este trabalho aos meus pais, **Rafael e Maria**, por terem me dado mais do que amor, carinho e estudo e por, direta e indiretamente, contribuir para que este sonho fosse realizado;

Ao meu filho, **Lucas**, amor da minha vida, pela compreensão dos momentos em que eu não estava presente, pelo ombro amigo, pela paciência, por me escutar, pela maturidade e por ser uma pessoa maravilhosa, da qual tanto me orgulho. Sua existência dá razão ao meu viver;

As minhas irmãs, **Sônia e Verônica**, pelo incentivo, pelas palavras assertivas, pelos conselhos e por multiplicar felicidade em minha vida;

A **Isabela, Mariana e Laura**, amorzinhos da titia, que são como flores do meu jardim, por existir, sonorizar, movimentar e alegrar meus dias.

Ao **Lúcio**, meu braço direito, ombro amigo, companheiro sempre presente. Por ampliar meus horizontes, pelos conselhos pertinentes, por dividir esta carga comigo, pelo bom humor e, sobretudo, pelo amor.

Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** por me mostrar o melhor caminho, me dar forças e olhar por mim.

A minha querida orientadora, **Dra. Luciana de Oliveira Andrade**, que me acolheu de braços abertos e permitiu que este sonho fosse realizado. Pelos ensinamentos, por encurtar os caminhos, pela paciência e perseverança, por acreditar em mim, enfim, pelo suporte diferenciado (pessoal e profissional). Sou muito grata a você!

Ao **Dr. Gregory Thomas Kitten** por sempre conseguir um tempo para nos socorrer, por contribuir com generosidade, bom humor e seriedade, por otimizar e consertar tudo o que podia e pela agradável convivência.

A querida **Dra. Bárbara Hissa**, pelo suporte técnico e emocional. Pelo companheirismo, sinceridade e sorriso. Por se importar! Pelas palavras certas nos momentos certos, e, principalmente, pela amizade.

A querida **Patrícia Pereira**, pela alegria, simplicidade, honestidade e fé. Pelos conselhos, companheirismo e amizade. Por se importar! Por me entender e, principalmente, pela amizade.

Deus os abençoe!

## AGRADECIMENTOS

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, por ajudar a construir meu conhecimento.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do departamento de Morfologia, em especial à Dra Cleida Oliveira, por manterem o sistema eficientemente o funcionando.

Aos professores Dr. Égler, Chiari, Dr. Hélio Chiarini, Dra. Elizabeth Ribeiro, Dra. Walderez Dutra, Dra. Patrícia Martinelli, Dr. Aristóboło Silva e Dr. Renato Mortara, por terem contribuído com disponibilização de equipamento ou materiais para a realização deste trabalho e, sobretudo, pelos bons exemplos.

Aos queridos amigos do LBCM, Patrícia, Thalita, Luísa, Rhyanne, Bruno e Lívia, pela ótima convivência, boa vontade, conselhos, esmero e organização.

Aos colegas do LABER, LBIC, Laboratório Conceição Machado e LGB, especialmente a Janine Ivo e ao Dr. Pedro Aguiar; pelo sorriso e pela boa vontade de sempre em ajudar.

Aos membros da banca, Dr<sup>a</sup> Annamaria Ravaro Vago, Dr<sup>a</sup> Andrea Mara Macedo e Dr<sup>a</sup> Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau, por gentilmente terem aceitado o convite e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Aos colegas da comissão organizadora do SBC 2012, por me apresentar um mundo novo, e em especial à Tatiane Almeida, pelo encorajamento, simpatia, otimismo e por ter me dado a oportunidade de fazer parte desta equipe.

Ao Dr. João Carlos Dias, por me escutar, entender e apoiar. Pelo exemplo e incentivo.

A Dra. Antoniana Krettli, Dra. Isabela Ceravolo, Dra. Glaécia Pereira, Nicolli Bellotti, Isabel Mayer, Anna Caroline Aguiar, Júlia Penna e Flávio Figueiredo, integrantes do LAMAL-René Rachou, por me apresentar e me ajudar a entender a ciência.

A Maria Cristina Mayer, por me ajudar a ficar no “eixo”.

Aos ex-IC's do LBCM, Suellen Martins e Juliano Souza, pela ótima convivência e pelas contribuições.

As agencias financiadoras CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para esta realização.

*“Somos o que repetidamente fazemos. A excelência, portanto, não é um feito, mas um hábito”.*  
Aristóteles



## RESUMO

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

O *Trypanosoma cruzi*, parasito intracelular obrigatório, ativa várias vias de sinalização celular, a maioria levando à liberação de cálcio de estoques intracelulares. O aumento do cálcio no citoplasma da célula hospedeira promove a exocitose de lisossomos, a qual desencadeia um processo de endocitose compensatória que culmina com a internalização do parasito em um vacúolo contendo porções de membrana lisossomal e plasmática. A este vacúolo recém-formado, mais lisossomos vão se fundindo, formando um vacúolo ácido onde as membranas do parasito e vacúolo permanecem fortemente associadas. Este processo é imprescindível para uma infecção viável, pois ancora o parasito na célula, impedindo seu escape para o meio extracelular. Além da função dos lisossomos durante a invasão, a interação do parasito com a membrana de seu vacúolo parasitóforo é também importante no momento de seu escape para o citosol celular, evento que permite sua diferenciação na forma amastigota replicativa. Portanto, a interação *T. cruzi* e membrana lisossomal é de suma importância para o estabelecimento da infecção. Sabe-se que o ácido siálico do hospedeiro, através da atividade das trans-sialidases do parasito, auxilia tanto na invasão quanto no escape do parasito de seu vacúolo parasitóforo. LAMP-1 e 2 são as proteínas de membrana majoritárias em lisossomos, sendo altamente sialiladas. Estudos realizados pelo nosso grupo, mostraram que a ausência destas duas proteínas, LAMP-1 e 2, na célula hospedeira diminui a taxa de invasão pelo *T. cruzi*, mas simultaneamente aumenta sua taxa de multiplicação intracelular. No entanto, não foi determinado se o fenótipo observado se devia ao elevado índice de ácido siálico dessas proteínas ou a outras características intrínsecas da cadeia polipeptídica. Desta forma, o objetivo do presente projeto é estudar melhor o papel e mecanismo pelo qual as duas isoformas participam do processo de infecção celular pelo *T. cruzi*. Para isso, realizamos experimentos de infecção celular utilizando células deficientes em LAMP-2, LAMP-1/2 ou células tipo selvagem. Observamos que tanto o fenótipo de invasão, quanto de multiplicação intracelular observado para células LAMP-1/2 KO foi reproduzido

pela ausência apenas de LAMP-2, indicando que esta proteína é mais importante para ambos os processos. Observamos ainda, através de ensaios de adesão e da morfologia do vacúolo parasitóforo, que muito provavelmente o fenótipo de invasão se deve a características intrínsecas da proteína e não as suas modificações glicídicas. A taxa de multiplicação celular também foi reproduzida apenas pela ausência de LAMP-2. No entanto, nesse caso, nossos dados sugerem que a taxa desse fenótipo possa ser consequência tanto de características intrínsecas da proteína, quanto de suas modificações glicídicas. Embora não significativamente, as células deficientes para LAMP-2 apresentaram uma maior tendência a um escape mais rápido do vacúolo parasitóforo. Pelos dados obtidos acreditamos que LAMP-2 seja uma proteína importante para a entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira, participando tanto do processo de invasão, quanto da colonização celular por esse parasito.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, LAMP, LAMP-2, lisossomos.

## ABSTRACT

PEDERSANE, D. Study of the differential paper of each of the lysosomal protein isoforms LAMP (LAMP-1 and LAMP-2) in the process of cell infection by *Trypanosoma cruzi*. 2014. Master Thesis. Institute of Biological Sciences - Cell Biology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014

*Trypanosoma cruzi*, an obligatory intracellular parasite, is capable of triggering a series of signaling events in host cells, many of them leading to calcium mobilization from intracellular stocks. Increase in cytosolic calcium leads to lysosomal exocytosis, which in turn is followed by a compensatory endocytosis event that drives *T. cruzi* into the host cell. Parasite initially resides in a vacuole containing both lysosome and plasma membrane. To this initial vacuole more lysosomes fuse until parasite is all covered with lysosomal markers. Membranes from lysosome derived vacuole and *T. cruzi* are found tightly apposed and this interaction is thought to be important for parasite retention inside host cells. Besides its role during invasion, lysosomes also play a role in *T. cruzi* escape from its parasitophorous vacuole into the host cell cytosol. The presence of both sialic acid in vacuolar membrane and trans-sialidases on parasite surface have been shown to interfere with this process. Once in the cytosol, parasites transform into the amastigote replicative form and start colonizing the host cell. LAMP-1 and 2 are the major components of lysosomal membranes and are also highly sialylated. Previous studies from our group have demonstrated that the absence of these two proteins in cells decrease parasite invasion. On the other hand it also increases parasite intracellular multiplication. The mechanism by which LAMP absence leads to these phenotypes is still not clear. Both sialic acid that modify these proteins and the polipeptide chain itself might be playing a role in both parasite invasion and intracellular multiplication. The main goal of this work is to better understand the role and mechanism by which both LAMP isoforms, LAMP-1 and 2 interfere with *T. cruzi* infection in host cells. For this we performed cell infection experiments using LAMP-2 and LAMP-1/2 knock out cells, as well as wild type cells. We have shown that both LAMP2 and LAMP-1/2 knock out cells present similar parasite invasion pattern, indicating that LAMP-2 plays a major role in this process. We have also shown that LAMP-2 absence compromises parasite adhesion without changing vacuole morphology. These data reinforce a role for the polypeptide chain itself and not its

sialic acid residues in the phenotype observed. Parasite intracellular multiplication was also similar in LAMP-2 and LAMP-1/2 knock out cells. However in this case our data suggest that both polipeptide chain and its sialic acid modifications might be playing a role. Although not statistically significant different from wild type infections in LAMP-2 knock out cells have shown a tendency for a faster rate of parasite escape from its parasitophorous vacuole. Based on our data we believe LAMP-2 plays an important role for *T. cruzi* infection in host cells, participating in both parasite invasion and intracellular multiplication.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, LAMP, LAMP2, lysosomes.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Bovine Serum Albumine

CHO - Chinese Hamster Ovary cells

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Dulbecco Modified Eagles' Médium

DNA – Deoxyribonucleic Acid

EDTA – Ethylene diamine tetra acetic acid

HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution

kDa – Kilodáton

KO – Knock-out ou deficiente

KO-L1 - Knock-out para LAMP-1

KO-L1/2 - Knock-out para LAMP-1 e 2

KO-L2 - Knock-out para LAMP-2

LAMP - Lysosome Associated Membrane Proteins

LAMP-1 - Lysosome Associated Membrane Protein-1

LAMP-2 - Lysosome Associated Membrane Protein-2

LGP - Lysosomal membrane Glycoprotein

LIMP - Lysosomal Integral Membrane Protein

LLC-MK2 - Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells

MHC - Complexo de histocompatibilidade

MOI - Multiplicity Of Infection

PBS - Phosphate Buffered Saline

PBS+/+ - Phosphate Buffered Saline com ions cálcio e magnésio

PFA - paraformaldeído

pH – Potencial hidrogeniônico

PHEM – Tampão feito com Pipes (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) + Hepes (4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid) + EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) + MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio)

PPD - p-Fenilenodiamina

RILP - Rab7-Interacting Lysosomal Protein

SFB - Soro Fetal Bovino

Tc ou *T.cruzi* - *Trypanosoma cruzi*

Tc-TOX - *T. cruzi* hemolysin (pretativa)

WT - Wild Type

$\beta$ -hexosaminidase - 6 mM de 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação de algumas das moléculas envolvidas no processo de interação entre o parasito e a célula do hospedeiro mamífero.	26
Figura 2 -	Modelo esquemático demonstrando resumidamente a internalização do tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> e seu alojamento no vacúolo parasitóforo na célula do hospedeiro mamífero	26
Figura 3 -	LAMP-1 e LAMP-2 humano: Alinhamento e homologia das sequências de aminoácidos.	31
Figura 4 -	Representação esquemática da vesícula lisossomal e algumas das estruturas encontradas em sua membrana, incluindo LAMP 1 e 2	32
Figura 5 -	Representação esquemática das proteínas LAMP1 e LAMP2	32
Figura 6 -	Fenotipagem dos fibroblastos utilizados no estudo	52
Figura 7 -	Imagens e representação gráfica do ensaio de invasão das formas infectivas de <i>T. cruzi</i> nos fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2.	53
Figura 8 -	Representação gráfica do ensaio de exocitose lisossomal em células WT, KO-L2 e KO-L1/2.	55
Figura 9 -	Imagens e representação gráfica do ensaio de adesão das formas infectivas de <i>T. cruzi</i> nos fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2.	57
Figura 10 -	Imagens e representação gráfica da análise da morfologia do vacúolo parasitóforo em células WT, KO-L2 e KO-L1/2.	59
Figura 11 -	Imagens e representação gráfica da multiplicação intracelular dos tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2	63
Figura 12 -	Imagens dos parasitos co-localizados com marcação para LAMP e	67

representação gráfica do recrutamento de lisossomos e escape do vacúolo parasitóforo em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2

Figura 13 - Representação gráfica da taxa de invasão e multiplicação de formas infectivas de *T. cruzi*, isolados de fibroblastos WT, KO-L1/2 ou KO-L2, em fibroblastos WT. 71

Figura 14 - Imagens e representação gráfica da taxa de adesão das formas infectantes de *T. cruzi* originadas em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 em fibroblastos WT. 73

Figura 15 - Diagrama relacionando os eventos observados nas células deficientes para LAMP-2 e para LAMP-1/2 em comparação com as células WT, nos processos experimentais de infecção celular pelo *T. cruzi*. 87



## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>08</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO. ....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos, clínicos e patogênese.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. O <i>Trypanosoma cruzi</i>: ciclo de vida e interação parasito-hospedeiro .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3. Lisossomo da célula hospedeira e “Lysosomal Associated Membrane Proteins”         (LAMP) .....</b>	<b>29</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>35</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Cultivo da linhagem celular LLC-MK2 .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2. Cultivo de fibroblastos .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3. Manutenção da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> e produção de formas         tripomastigotas do parasito .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4. Infecção celular de <i>Trypanosoma cruzi</i> em fibroblastos WT, KO-L1 e/ou L2 –         ensaios de invasão e multiplicação intracelular .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5. Avaliação do recrutamento de lisossomos e escape do vacúolo parasitóforo .....</b>	<b>44</b>
<b>4.6. Análise da morfologia do vacúolo parasitóforo em células WT, KO-L1/2 e         KO-L2.....</b>	<b>45</b>
<b>4.7. Avaliação da taxa de exocitose lisossomal em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-         L1/2 .....</b>	<b>47</b>

4.8. Ensaio de adesão celular do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	48
4.9. Análises estatísticas .....	48
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1. Ensaio de invasão celular em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 expostos aos tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	50
5.2. Ensaio de exocitose de lisossomos em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 ...	54
5.3. Ensaio de adesão celular em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 expostos aos tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> isolados de células LLC-MK2 .....	56
5.4. Avaliação da morfologia do vacúolo parasitóforo em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 expostos aos tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> originados de cultura de células LLC-MK2 .....	58
5.5. Ensaio de multiplicação intracelular em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 infectados com tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	61
5.6. Ensaio de formação e escape do vacúolo parasitóforo em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 infectados com tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	65
5.7. Ensaio de invasão e multiplicação celular de formas infectivas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> cultivados em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 .....	70
5.8. Ensaio de adesão celular em fibroblastos WT expostos aos tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> isolados de fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2..	72
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>90</b>



## 1. INTRODUÇÃO

Em 1909, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas apresentava ao mundo científico a ocorrência de uma nova doença humana, de caráter infeccioso. Em um feito único, Chagas descreveu o agente causador da doença, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, o vetor de transmissão (um reduvídeo hematófago conhecido popularmente como barbeiro), bem como aspectos clínicos associados a essa infecção em humanos (Chagas 1909). Em homenagem a ele, esta zoonose foi chamada de doença de Chagas, enquanto a espécie do parasito foi nomeada com intuito de homenagear Oswaldo Cruz, chefe de Carlos Chagas na época do descobrimento da doença (Coura 2013).

### 1.1. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos, clínicos e patogênese

Dada a distribuição e ocorrência natural do inseto vetor, a doença de Chagas é originalmente uma doença de natureza endêmica, restrita ao continente Americano, acometendo indivíduos desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e Chile (Prata 2001, Coura e Dias 2009). Os vetores fazem parte da família Reduviidae, subfamília Triatominae. No Brasil, estes insetos são conhecidos vulgarmente como "barbeiros", devido ao seu hábito de picar a face das pessoas. Das espécies vetoriais mais significativas para a transmissão do *T. cruzi*, o *Triatoma infestans* é considerado historicamente a principal, uma vez que constitui a espécie encontrada predominantemente nos ambientes domiciliares ou peri-domiciliares (Ceballos, Piccinali et al. 2011). Devido à sua importância, em 1991 iniciou-se um programa de eliminação da transmissão vetorial domiciliar do *T. cruzi*, "The Southern Cone Initiative" ou Iniciativa do Cone Sul, que visava a erradicação do vetor em ambientes domiciliares ou peri-domiciliares. A iniciativa foi eficaz e regrediu a transmissão vetorial na maior parte da

América do Sul (Schofield e Dias 1999). Entretanto, em algumas áreas, principalmente na região do “grande Chaco”, entre o Norte da Argentina, Bolívia e Paraguai, não houve grande sucesso (Gurtler, Kitron et al. 2007), permanecendo a infecção por esta espécie transmissora. Além disso, com a eliminação de vetores domiciliares e com uma vigilância não contínua em algumas regiões, espécies anteriormente silvestres passaram a ocupar esse habitat se tornando importantes novos agentes de transmissão (Silveira e Dias 2011).

No Brasil, a doença se espalha por uma grande área do território, abrangendo 2.943 municípios e deixando sob o risco de infecção 28 milhões de pessoas. A população infectada pelo *T. cruzi* chega a 2,5 milhões de indivíduos, sendo 60% na área urbana, e compreendem, em sua maioria, indivíduos de origem rural e pertencentes aos níveis socioeconômicos mais baixos, contaminados através de fezes infectadas de insetos vetores (Amato Neto e Pasternak 2009). A morbimortalidade da doença de Chagas no Brasil é bastante significativa, vitimando 25% ou mais dos indivíduos infectados, que adquirem cardiopatia chagásica crônica evolutiva (Amato Neto e Pasternak 2009).

Além da transmissão natural através do inseto vetor, a transmissão do *T. cruzi* pode ainda ocorrer por via oral, transfusão sanguínea, congênita ou por transplantes de órgãos. Assim, devido ao êxodo de milhões de latino americanos, dentre eles indivíduos infectados, para outros países do mundo e às formas alternativas de transmissão, novos casos da doença foram surgindo em regiões não endêmicas (Coura e Vinas 2010). Nessas regiões, a transmissão por transfusão sanguínea e transplante de órgãos são os principais meios de dispersão da doença (Albajar-Vinas e Jannin 2011). Como consequência, a doença de Chagas passou a ser um desafio para todo o mundo, e passa a necessitar de diretrizes mais abrangentes.

Juntamente com outras parasitoses, como malária, leishmaniose e esquistossomose, a doença de Chagas é uma das doenças parasitárias mais graves da América Latina. Esta doença promove alta morbidade além de mortalidade precoce, ocorrendo muitas das vezes em adultos jovens, ou seja, na população mais produtiva. Isso resulta em perda econômica significativa, causando alto impacto socioeconômico (Franco-Paredes, Von et al. 2007). Além disso, as complicações cardíacas e digestivas decorrentes das manifestações clínicas da infecção, frequentemente levam à necessidade de caros procedimentos de tratamento cirúrgico. (Franco-Paredes, Von et al. 2007).

A infecção possui duas fases. Uma fase inicial, de curta duração, denominada aguda, onde se pode encontrar uma grande quantidade de parasitos circulantes no sangue. Na maioria dos casos, os sintomas estão ausentes ou são leves nessa fase, possivelmente devido ao baixo inóculo durante a transmissão natural (Coura, Anunziato et al. 1983). Dentre os sintomas mais comuns podemos destacar a ocorrência de dores de cabeça, hiperplasia dos gânglios linfáticos, palidez, dor muscular e febre (Prata 2001, Bern, Martin et al. 2011).

A fase subsequente é de longa duração, denominado de fase crônica, e inicia cerca de dois a três meses após a infecção (Rassi, Rassi et al. 2010). A princípio, os indivíduos não apresentam sintoma clínico da infecção, sendo denominados de assintomáticos ou indeterminados. Nessa fase, há grande diminuição dos parasitos no sangue e nos tecidos. No entanto, pode se detectar a presença de anticorpos circulantes contra vários antígenos do *T. cruzi* (revisto por Dutra, Menezes et al. 2009, Coura e Borges-Pereira 2011). De acordo com estudos feitos por Coura e colaboradores entre 1975 e 2010, em torno de 60% dos pacientes na forma indeterminada não desenvolvem sintomas clínicos da infecção ou irão apresentar sintomas leves, mas sem grandes consequências para o paciente (Coura e Borges-Pereira 2011). Entretanto, parte desses pacientes na forma indeterminada, entre 10 e 40% (variando

de região para região), pode evoluir para formas sintomáticas graves com acometimentos cardíacos e/ou digestivos (revisto por Dutra e Gollob 2008, Coura e Borges-Pereira 2011). Dentre as formas sintomáticas, as complicações cardíacas são o aspecto clínico mais importante da doença de Chagas, devido a sua frequência e gravidade (Rassi, Rassi et al. 2006, Rassi, Rassi et al. 2007). A cardiomiopatia chagásica é caracterizada por destruição do sistema de condução, aneurisma apical do ventrículo esquerdo, hipertrofia cardíaca, inflamação crônica e fibrose, levando o paciente à uma grave insuficiência e finalmente falência do órgão (Andrade 1982, Nunes, Dones et al. 2013). A forma digestiva da doença, embora seja em geral menos frequente, é tão debilitante quanto a cardiomiopatia chagásica (Campos e Tafuri 1973). Dentre os órgãos afetados no trato digestivo as alterações mais importantes são do esôfago e intestino, caracterizados pelo megaesôfago e megacólon (Campos e Tafuri 1973, Matsuda, Miller et al. 2009).

Pode-se notar que a infecção tem curso clínico bastante variável e, infelizmente, ainda não há hoje um marcador ou marcadores determinantes da evolução clínica (Coura e Borges-Pereira 2011). Inicialmente, devido ao baixo número de parasitos no sangue ou tecidos de pacientes e a presença de anticorpos auto-reativos, acreditava-se que a doença era consequência de um processo puramente autoimune desencadeado inicialmente pela infecção (Molina, Milei et al. 1984, Acosta e Santos-Buch 1985, Cossio, Casanova et al. 1985). No entanto, com o advento de técnicas mais sensíveis, como a PCR e a hibridização *in situ*, foi possível demonstrar a presença e permanência do parasito em órgãos afetados durante a fase crônica da infecção (Vago, Macedo et al. 1996, Anez, Carrasco et al. 1999, Vago, Andrade et al. 2000, Lages-Silva, Crema et al. 2001). Além disso, a melhora clínica de pacientes tratados com drogas anti-parasitos ressalta a importância da persistência do *T. cruzi* no desenvolvimento da doença (Viotti, Vigliano et al. 1994). Embora ainda haja muita discussão sobre o tema, hoje a teoria mais aceita é de que ambos, parasito e resposta imune do

hospedeiro são de fundamental importância para a evolução clínica da doença, sendo que a infecção celular parece ter papel fundamental neste processo (Andrade, Machado et al. 1999, Andrade, Machado et al. 2002, Andrade, Galvao et al. 2010).

## **1.2. O *Trypanosoma cruzi*: ciclo de vida e interação parasito-hospedeiro**

O *T. cruzi* é um flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, que apresenta no interior da mitocôndria uma alta concentração de DNA extra nuclear, que forma uma estrutura denominada cinetoplasto. O *T. cruzi* apresenta um complexo ciclo de vida envolvendo dois hospedeiros, um invertebrado (o inseto vetor) e um vertebrado que pode variar desde pequenos mamíferos até o homem. No hospedeiro invertebrado podem ser encontradas as formas epimastigotas do parasito, formas flageladas capazes de se multiplicar por divisão binária no intestino médio do inseto. Após a multiplicação, essas formas migram para o intestino posterior e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, forma também flagelada, porém não replicativa. Essa é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado e, durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo libera essas formas junto com as fezes sobre a pele ou mucosa do vertebrado. A penetração do parasito pode se dar diretamente pela mucosa ou através do orifício da picada e lesões da pele, durante o ato de coçar a região da picada. Os tripomastigotas metacíclicos podem invadir uma variedade de células e iniciam o ciclo infectando aquelas próximas ao local de penetração. A invasão pelas formas tripomastigotas se dá através da formação de um vacúolo parasitóforo na célula hospedeira, o qual é posteriormente rompido, liberando-as no citosol da célula. No citoplasma da célula hospedeira, essas formas se diferenciam em amastigotas, aflageladas e replicativas, que iniciam o processo de multiplicação intracelular por divisão binária. Após vários ciclos de multiplicação, essas formas amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas



sanguíneas, flageladas e não-replicativas, as quais promovem a ruptura da membrana da célula e são liberadas para o meio extracelular. No meio extracelular, essas formas podem infectar células vizinhas ou serem disseminadas através dos vasos linfáticos e /ou sanguíneos para outros locais do corpo. As formas tripomastigotas sanguíneas, como as tripomastigotas metacíclicas são capazes de infectar variados tipos celulares, embora sejam preferencialmente encontradas em células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) dando continuidade ao ciclo no hospedeiro vertebrado. O ciclo de transmissão é concluído quando tripomastigotas sanguíneas, circulantes no hospedeiro vertebrado, são ingeridos por triatomíneos durante o repasto sanguíneo.

A invasão celular durante a colonização do hospedeiro vertebrado pelo *T. cruzi* é um mecanismo usado por muitos microrganismos para o estabelecimento da infecção e sua virulência é criticamente dependente dessa habilidade. De fato, como mencionado anteriormente, relatos da literatura mostram claramente a importância deste processo no estabelecimento e evolução clínica da doença de Chagas (Andrade, Machado et al. 1999, Andrade, Galvao et al. 2010, Corral, Guerrero et al. 2013). Para isso, o parasito emprega estratégias para interação com componentes do hospedeiro.

Como se sabe, no hospedeiro vertebrado, o *T. cruzi* é um parasito intracelular obrigatório, e, portanto, necessita interagir com a célula hospedeira para poder infectá-la. Ele é capaz de invadir e de se replicar dentro uma grande variedade de células nucleadas de mamíferos, desde as fagocíticas profissionais até as fagocíticas não profissionais (Munoz-Fernandez, Fernandez et al. 1992, Andrade e Andrews 2005, Yoshida 2009). Entre as fagocíticas profissionais, destaca-se o macrófago tecidual, a qual seria uma das primeiras células alvo da infecção (Munoz-Fernandez, Fernandez et al. 1992) e também a primeira célula de defesa contra o parasito nos mamíferos (Kierszenbaum, Knecht et al. 1974, Tanowitz, Wittner et al. 1975). Dentre as fagocíticas não profissionais, o parasito apresenta

uma notável capacidade de invadir qualquer tipo de célula hospedeira nucleada, como demonstrado por experimentos *in vitro* usando diversos tipos celulares (Andrade and Andrews 2004, de Melo-Jorge e PereiraPerrin 2007, Andrade, Galvao et al. 2010, Fernandes, Cortez et al. 2011, Ferreira, Segatto et al. 2011).

Durante a colonização do hospedeiro vertebrado, para que a infecção celular aconteça, o *T. cruzi* atravessa a matriz extracelular e interage com a célula hospedeira, desencadeando uma série de eventos em cascata, que culminam com sua internalização em um compartimento membranar, denominado vacúolo parasitóforo (Burleigh e Andrews 1998, Yoshida 2006, Fernandes e Andrews 2012). Os passos do processo de interação entre o *T. cruzi* e a célula hospedeira podem ser divididos em três estágios distintos: adesão e reconhecimento, sinalização e internalização (Schenkman, Jiang et al. 1991, Ciavaglia, De Carvalho et al. 1993, Tardieux, Nathanson et al. 1994, Rodriguez, Martinez et al. 1999, Andrade e Andrews 2004, Fernandes, Cortez et al. 2011). O primeiro passo da interação do parasito é o contato e adesão de moléculas do parasito com a célula hospedeira, a partir do qual podem ser desencadeados processos de sinalização intracelular, tanto do lado do parasito quanto do hospedeiro (Yoshida, Mortara et al. 1989, Ruiz, Rigoni et al. 1993, Burleigh, Caler et al. 1997, Yoshida, Dorta et al. 1997, Favoreto, Dorta et al. 1998, Ruiz, Favoreto et al. 1998, Scharfstein, Schmitz et al. 2000). Várias moléculas da célula e do parasito participam deste processo de adesão e sinalização celular (Figuras 1 e 2).

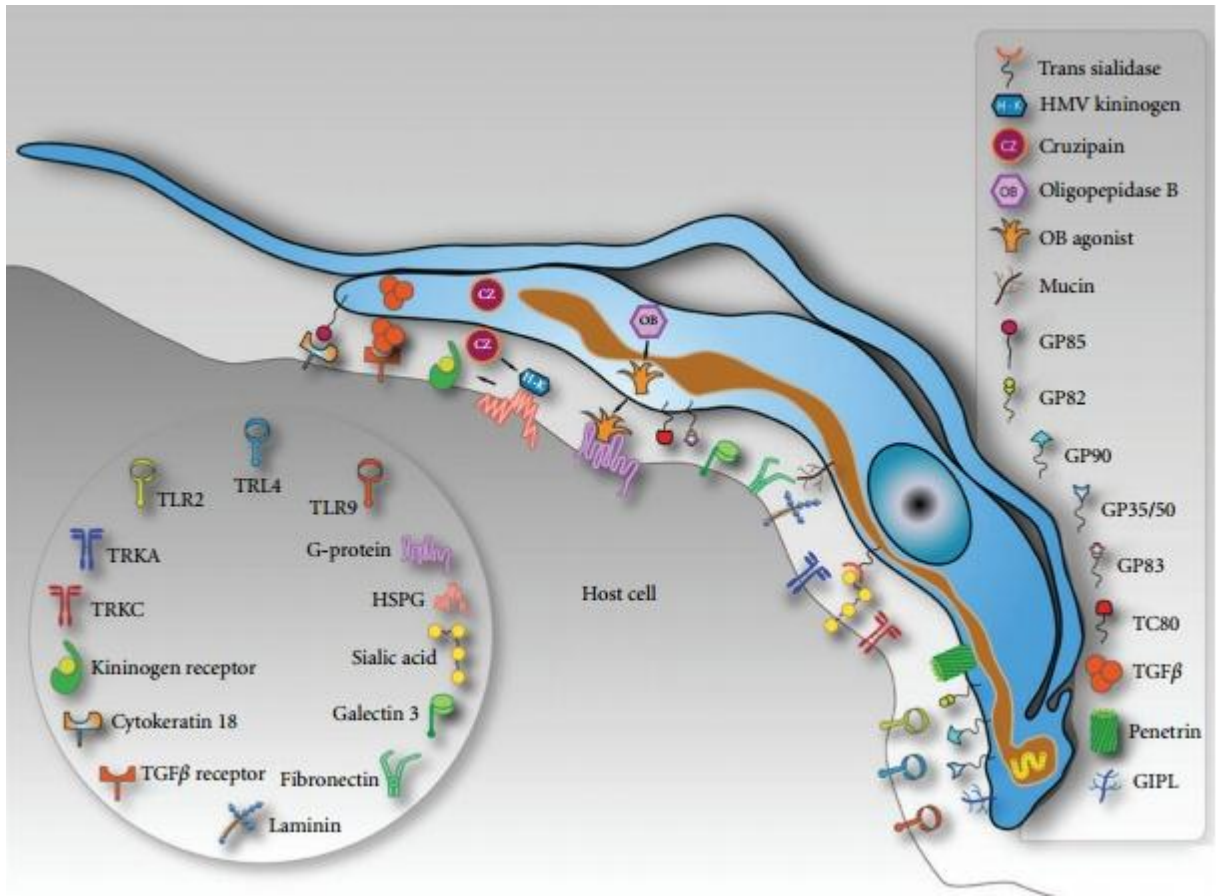


Figura 1 - Modelo esquemático resumindo as moléculas envolvidas no processo de interação entre o parasito e a célula do hospedeiro mamífero (de Souza et al. 2010)

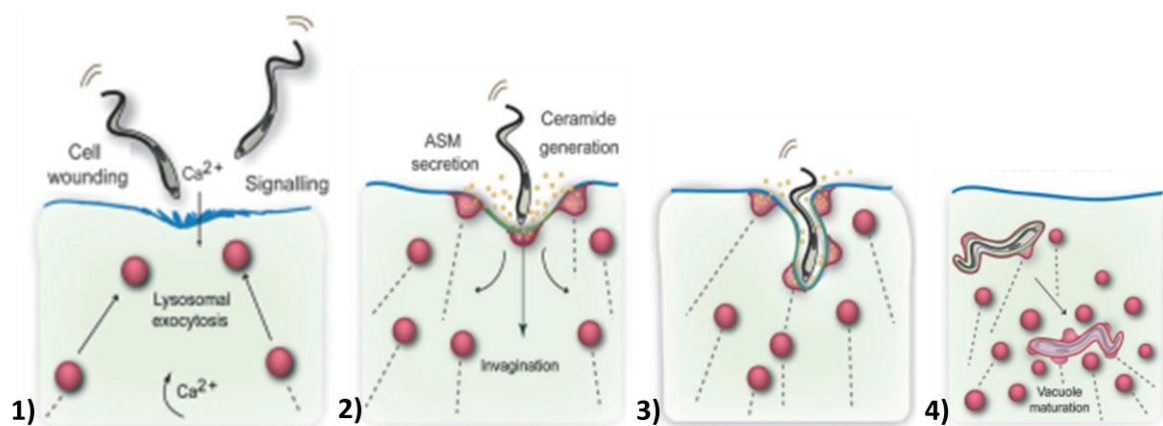


Figura 2 - Modelo esquemático demonstrando: 1) o recrutamento de lisossomos para o local de interação do parasito com a célula hospedeira, 2) exocitose de lisossomos gerando ceramida e, por isso, promovendo endocitose compensatória com conseqüente 3) internalização do parasito na célula. Em 4) observa-se o parasito dentro do vacúolo parasitóforo onde mais vesículas lisossomais se fundem promovendo o amadurecimento do vacúolo. (Fernandes et al, 2012).

Dentre as moléculas que participam dos processos de adesão, podemos destacar as trans-sialidases. As trans-sialidases (TS) são enzimas do parasito que transferem resíduos de ácido siálico  $\alpha$ -2,3-ligado de glicoconjugados presentes na célula hospedeira para as moléculas de mucinas presentes na membrana do parasito (Previato, Andrade et al. 1985, Schenkman, Diaz et al. 1991, Schenkman, Kurosaki et al. 1992, Schenkman, Vandekerckhove et al. 1993). Sabe-se que sua ação nos processos de adesão e internalização do parasito na célula hospedeira depende de sua ligação com ácido siálico nessa célula, mas não necessariamente de sua atividade enzimática. (Ciavaglia, De Carvalho et al. 1993, Ming, Chuenkova et al. 1993, Schenkman, Vandekerckhove et al. 1993; Chuenkova e Pereiraperrin 2006, Rubin-de-Celis, Uemura et al. 2006).

Além das TS, várias outras moléculas do parasito participam do processo de adesão e internalização do *T. cruzi*. Muitas dessas estão envolvidas na estimulação de um sinal de cálcio na célula hospedeira, que é responsável pelo recrutamento e fusão de lisossomos com a membrana plasmática (Tardieux, Nathanson et al. 1994, Dorta, Ferreira et al. 1995, Rodriguez, Webster et al. 1997, Rodriguez, Martinez et al. 1999). Essas moléculas do parasito são capazes de se ligar à receptores na célula hospedeira e de promover a liberação de cálcio de estoques intracelulares para o citoplasma da célula. O produto da enzima oligopeptidase B, um tipo de serino-peptidase citosólica do parasito, é um dos agonistas de cálcio mais bem estudados na interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira. O produto dessa enzima é secretado pelo *T. cruzi* e se liga aos receptores de superfície acoplados à proteína G, estimulando a liberação de cálcio de estoques intracelulares (Burleigh, Caler et al. 1997, Caler, Vaena de Avalos et al. 1998, Leite, Moyer et al. 1998). A cruzipaína, enzima secretada pelo parasito, é capaz de clivar cininogênio e, por conseguinte, liberar bradicinina (Del Nery, Juliano et al. 1997). Por sua vez, a bradicinina se liga ao seu receptor na célula hospedeira promovendo a liberação de cálcio de estoques intracelulares (Scharfstein, Schmitz et al.

2000). As glicoproteínas GP82 e GP 35/50 do parasito também são capazes de desencadear sinais de cálcio na célula hospedeira, embora GP82 com mais eficiência (Yoshida e Nachmias 1989, Ramirez, Ruiz Rde et al. 1993). Além de sinais de cálcio gerados indiretamente pela ligação de proteínas do parasito com receptores na superfície da célula hospedeira, o parasito também é capaz de gerar aumento de cálcio citosólico por influxo direto de cálcio vindo do meio extracelular. Isso ocorre após microinjúrias provocadas na membrana da célula hospedeira pelo parasito, as quais levam a um rápido influxo de cálcio livre no citoplasma (Fernandes, Cortez et al. 2011).

O influxo de cálcio é responsável pelo recrutamento e fusão de lisossomos com a membrana celular, no local ou próximo ao local de invasão pelo parasito. Ao se fundir, o lisossomo libera suas enzimas para o meio extracelular. Dentre elas, a esfingomielinase ácida possui especial importância na internalização do *T. cruzi* (Fernandes, Cortez et al. 2011, Fernandes e Andrews 2012), pois é capaz de clivar resíduos de esfingomielina presentes na membrana do hospedeiro, transformando-os em ceramida. A ceramida tende a se agrupar e induzir uma endocitose compensatória (Tam, Idone et al. 2010). Durante a endocitose compensatória o parasito é internalizado em um vacúolo formado por membrana plasmática e lisossomal (Fernandes, Cortez et al. 2011). Gradualmente, mais lisossomos vão se fundindo até que o vacúolo parasitóforo esteja recoberto por marcadores lisossomais. Este processo é de extrema importância para a viabilidade da infecção, pois sem a fusão lisossomal os parasitos são capazes de escapar da célula hospedeira (Andrade e Andrews 2004). Estudos revelaram ainda que quando detectados imediatamente antes da invasão, os lisossomos recrutados encontram-se predominantemente associados com a região posterior do parasito, porção por onde é iniciada a invasão (Tardieux, Webster et al. 1992, Fernandes, Cortez et al. 2011). Dessa forma, a membrana vacuolar recém formada, bem como a adição de mais membrana

lisossomal ao vacúolo teria a função de puxar o parasito e ancorá-lo dentro da célula (Andrade e Andrews 2004, Fernandes, Cortez et al. 2011).

Após a internalização, o parasito permanece no vacúolo parasitóforo formado por membrana lisossomal por um período que pode variar entre 1 e 8 horas, dependendo da cepa e do tipo celular, quando então o vacúolo é rompido e o parasito liberado no citoplasma (Andrade e Andrews 2004). O escape acontece em consequência à ativação de uma proteína, chamada Tc-Tox, formadora de poro do parasito no ambiente ácido do vacúolo parasitóforo. No citoplasma, as formas tripomastigotas infectivas sofrem total reorganização estrutural, transformando-se na forma amastigota, replicativa, para a colonização da célula hospedeira.

### **1.3. Lisossomo da célula hospedeira e “*Lysosomal Associated Membrane Proteins*” (LAMP)**

Os lisossomos são organelas dinâmicas que atuam como compartimento terminal de muitas moléculas provenientes das vias endocíticas e autofágicas destinadas a destruição ou reciclagem (Luzio, Pryor et al. 2007). São delimitados por membranas, apresentam pH ácido, ricos em hidrolases (enzimas capazes de degradar a maioria das macromoléculas) e podem ser distinguidos dos endossomos por não possuírem receptores de manose 6-fosfato (Eskelinen, Tanaka et al. 2003). Entre suas funções encontram-se a renovação de proteínas celulares, regulação negativa de receptores de superfície, liberação de nutrientes endocitados, inativação de patógenos e acoplagem de antígenos processados a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Mullins e Bonifacino 2001). Os lisossomos podem apresentar ainda outras funções celulares, como degradação extracelular, reparo de membrana

e secreção de macromoléculas (Reddy, Caler et al. 2001, Eskelinen, Tanaka et al. 2003, Marks, Heijnen et al. 2013).

A membrana dos lisossomos possui colesterol e uma composição fosfolipídica característica, além de ser extremamente rica em carboidratos (Eskelinen, Tanaka et al. 2003). Várias proteínas de membrana dos lisossomos são essenciais para a função dessa organela (figura 3). As mais abundantes são: *Lysosome Associated Membrane Proteins* (LAMPs), *Lysosomal membrane Glycoproteins* (LGPs) e *Lysosomal Integral Membrane Proteins* (LIMPs) (Fukuda 1991, Eskelinen, Tanaka et al. 2003). LAMPs e LIMPs constituem mais de 50% das proteínas de membrana de lisossomos (Eskelinen 2006). Existem na célula duas isoformas distintas de LAMP: LAMP-1 e LAMP-2. Estas duas glicoproteínas são estruturalmente muito parecidas (Figura 4). Contudo, apesar dos 37% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos, divergiram ao longo da evolução. Esse fato é evidenciado por sua localização em diferentes cromossomos (revisto por Fukuda 1991). A região N-terminal dessas proteínas está voltada para o lúmen enquanto que o C-terminal está na porção citoplasmática. A região N-terminal apresenta 2 domínios dissulfídicos separados por uma região rica em prolina que se assemelha a uma “dobradiça”, e é altamente glicosilada, rica em ácido siálico (Lewis, Green et al. 1985, Chen, Chen et al. 1986, Granger, Green et al. 1990, Fukuda 1991). Essas glicosilações presentes em LAMP recobrem aproximadamente 80% da superfície interna da organela e acreditava-se que ambas as isoformas possuíam como principal papel a proteção da membrana lisossomal contra a degradação por hidrolases luminiais (Granger, Green et al. 1990, revisto por Fukuda 1991).

Apesar das semelhanças e de algumas funções em comum, LAMP-1 e LAMP-2 possuem funções distintas (Tabela 3) (Cuervo e Dice 1996, Andrejewski, Punnonen et al. 1999, Nishino, Fu et al. 2000, Tanaka, Guhde et al. 2000, Eskelinen, Illert et al. 2002, Eskelinen, Tanaka et al. 2003, Huynh, Eskelinen et al. 2007).



Figura 3 - LAMP-1 e LAMP-2 humano: (A) Alinhamento e (B) homologia das seqüências de aminoácidos. Em A, aminoácidos idênticos são encaixotados e resíduos de cisteína estão circulos. No grupo B, os resíduos de aminoácidos que diferem estão marcados por asteriscos. (Fukuda *et al*, 1988)



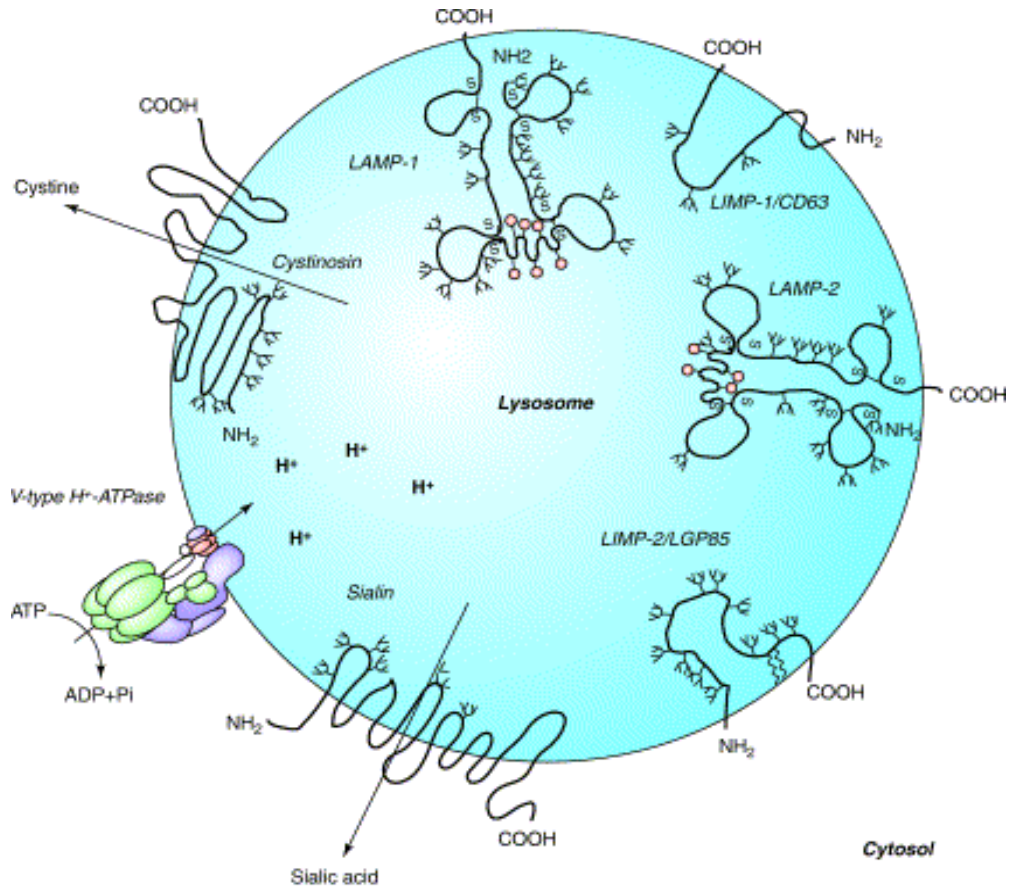


Figura 4 - Representação esquemática da vesícula lisossomal e algumas das estruturas de membrana, incluindo LAMP 1 e 2. (Eskelinen *et al*, 2003)

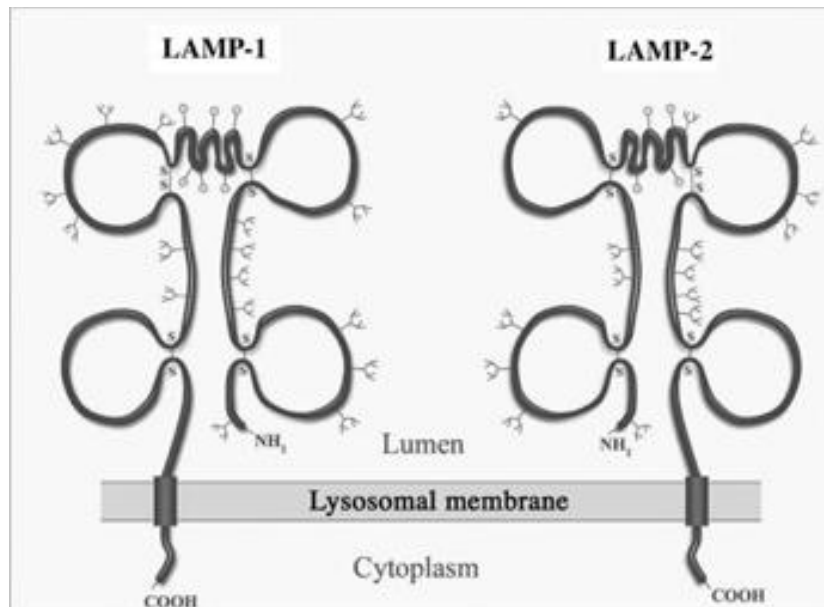


Figura 5 - Representação esquemática das proteínas LAMP1 e LAMP2. Mostrando suas glicosilações, um único domínio transmembrana e um curto domínio citoplasmático de 10-11 aminoácidos. Os domínios luminais onde as glicoproteínas contêm quatro pares de resíduos cisteína localizados em posições relativamente conservadas. As cisteínas vizinhas formam ligações dissulfídicas formando assim quatro loops. FONTE?

A geração de camundongos deficientes em LAMP-1 ou em LAMP-2 permitiu um melhor entendimento destas proteínas in vivo. Camundongos deficientes para LAMP-1 (KO-L1) apresentaram-se férteis e viáveis, com propriedades lisossomais normais, embora apresentem leve astrogliose regional e alteração da imunorreatividade cerebral a Catepsina-D. Observou-se ainda um aumento na quantidade de LAMP-2 em alguns tecidos, o que poderia estar ligado a um mecanismo compensatório pela falta de LAMP-1 (Andrejewski, Punnonen et al. 1999). A deficiência de LAMP-2 (KO-L2), por outro lado, causa sérias anomalias aos camundongos, onde, mesmo sendo férteis, fêmeas deficientes para LAMP-2 apresentaram redução do tamanho da ninhada e do tempo de vida dos filhotes. Neles, foram observados 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, Guhde 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, Illert et al. 2002).

Animais deficientes em LAMP-1 e 2 (KO-L1/2), simultaneamente, também foram gerados, porém morrem ainda no estágio embrionário (Eskelinen, Schmidt et al. 2004). Os tecidos destes embriões apresentaram muito mais vacúolos citoplasmáticos que os controles e grande parte deles foi identificado como autofágico. Foi visto ainda que, a maturação inicial dos autofagossomos é funcional, mas há um atraso nas etapas finais (Eskelinen, Schmidt et al. 2004). Huynh e colaboradores observaram ainda que, embora a capacidade fagocítica das células seja preservada, há um atraso na maturação das vesículas endocíticas, com comprometimento da fusão com vesículas lisossomais (Huynh, Eskelinen et al. 2007). Esses autores ligaram esta deficiência com uma menor mobilidade dos lisossomos, provavelmente por uma dificuldade no recrutamento de proteínas motoras.



## 2. JUSTIFICATIVA

Como referido anteriormente, a invasão celular pelo *T. cruzi* ocorre através da interação de moléculas do parasito que se ligam e estimulam a superfície da célula hospedeira, disparando uma série de sinais que culminam com a internalização do parasito. A internalização ocorre através da formação de um vacúolo parasitóforo inicial, formado de membrana plasmática e membrana lisossomal, via um processo de endocitose compensatória gerado pela fusão de lisossomos com a membrana plasmática da célula hospedeira (Fernandes, Cortez et al. 2011). A este vacúolo, mais lisossomos vão se fundindo até que todo o vacúolo contenha marcadores lisossomais. Durante todo o processo de formação e maturação desse vacúolo, as membranas do parasito e vacuolar encontram-se intimamente justapostas (Lopez, Huynh et al. 2002). Isto parece ser importante, uma vez que o processo de internalização do parasito ocorre por sua porção posterior, porção contrária à qual o parasito se movimenta. De alguma forma, a interação com esta membrana vacuolar segura o parasito e o puxa para dentro da célula. De fato, foi demonstrado que células deficientes em ácido siálico formam vacúolos mais largos e internalizam menos parasitos (Lopez, Huynh et al. 2002), mostrando que a membrana do vacúolo deve conter grande quantidade desse açúcar. Com base nesses dados, acredita-se que a forte associação entre as moléculas de superfície do tripomastigota e a superfície luminal, rica em ácido siálico, dos lisossomos da célula hospedeira poderia funcionar tanto para prevenir a liberação de conteúdos lisossomais durante a invasão pelo *T. cruzi*, como para estabilizar o processo de internalização, formando vacúolos parasitóforos mais justapostos sem a presença de espaço intravacuolar. Além disso, foi demonstrado que a fusão lisossomal para formação do vacúolo parasitóforo é imperativa

para uma infecção viável, já que na ausência desse processo os parasitos escapam da célula hospedeira(Andrade e Andrews 2004).

Como mencionado anteriormente, após a entrada na célula hospedeira, o tripomastigota pode permanecer neste vacúolo por um período variado, dependendo do tipo celular, até escapar para o citoplasma da célula (Andrade e Andrews 2005). Dentro desse vacúolo, o *T. cruzi* já pode iniciar seu processo de diferenciação em amastigota, forma replicativa e não-flagelada, processo que só se completa após seu escape para o citoplasma celular (Ley, Robbins et al. 1990). A formação de um vacúolo ácido, derivado da fusão lisossomal, tem papel essencial para o egresso do parasito para o citosol da célula hospedeira (Ley, Robbins et al. 1990). A Tc-TOX, uma proteína pretativa secretada pelo parasito que possui capacidade de formar poros em pH ácido, parece ser responsável pelo rompimento deste vacúolo e então liberação do *T. cruzi* na célula hospedeira (Andrews, Abrams et al. 1990). As trans-sialidases, uma família de proteína do parasito, parecem também ter participação neste processo. As trans-sialidases, como descrito no item 1.2, são enzimas responsáveis pela transferência de resíduos de ácido siálico de glicoproteínas da célula hospedeira para resíduos de açúcar presentes em proteínas de superfície do parasito, uma vez que o parasito não é capaz de produzir ácido siálico. Dados, publicados por Hall e colaboradores em 1992, mostraram que a capacidade de formação de poros pela Tc-Tox é afetada pela quantidade de ácido siálico presente na membrana alvo. Membranas desialiladas são mais facilmente atingidas pela ação da Tc-tox (Hall, Webster et al. 1992). Além disso, outros autores também demonstraram que parasitos que superexpressam trans-sialidases são mais competentes no escape do vacúolo parasitóforo e na replicação intracelular.

Os dados apresentados ressaltam a importância dos lisossomos e de membranas ricas em ácido siálico na infecção celular pelo *T. cruzi*. Uma vez que as membranas lisossomais estão repletas de proteínas altamente glicosiladas e sialiladas, é possível que o parasito use as

proteínas integrais de membrana lisossomal como doadores de ácido siálico para os processos mencionados acima. Uma vez que LAMP-1 e 2 são as proteínas integrais de membrana predominantes em lisossomos e as que apresentam maior número de resíduos de ácido siálico, nosso grupo resolveu estudar a importância destas proteínas no processo de entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira. Estudos *in vitro* realizados com fibroblastos extraídos de camundongos KO-L1/2, imortalizados, mostraram que a taxa de infecção nestas células é muito menor quando comparada às células tipo selvagem (WT), sugerindo a participação dessas proteínas durante o processo de invasão (Albertti, Macedo et al. 2010). Esses resultados corroboram com dados da literatura que demonstram que a presença de LAMP-1 na superfície celular leva a um aumento da interação e internalização do parasito na célula hospedeira (Kima, Burleigh et al. 2000). Outro resultado interessante, encontrado nesse estudo, foi que o desenvolvimento intracelular dos parasitos internalizados era muito maior em células KO-L1/2, quando comparados com células tipo selvagem (Albertti, Macedo et al. 2010). A partir desses dados e de outros da literatura demonstrando a importância do ácido siálico nesses mesmos processos, postulou-se que os resíduos de ácido siálico presentes em LAMP seriam responsáveis pelos fenótipos observados. No entanto, conforme já descrito anteriormente, embora com razoável homologia de sequência e estruturalmente semelhantes, LAMP-1 e 2 apresentam características e funções diferenciadas. Dessa forma, decidimos nesse trabalho avaliar separadamente a função da isoforma LAMP-2 e indiretamente da isoforma LAMP-1 nos processos de infecção celular pelo *T. cruzi*, comparando o comportamento da interação e infecção do *T. cruzi* com células WT, KO-L1/2 e KO-L2.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência das isoformas da proteína lisossomal LAMP, LAMP-1 e 2, no processo de invasão e desenvolvimento intracelular do *Trypanosoma cruzi* na célula hospedeira, utilizando células deficientes para LAMP-2, comparando com células tipo selvagem ou deficientes par ambas isoformas de LAMP, 1 e 2.

#### 3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar o efeito da ausência de LAMP-2, comparando com células WT e/ou KO-L1/2:

- Nos processos de invasão celular pelo *T. cruzi*;
- No tráfego intracelular do *T. cruzi*;
- Na multiplicação intracelular do *T. cruzi*.

3.2.2. Avaliar o efeito da ausência de LAMP-2 ou ambas as isoformas, LAMP-1 e 2, comparando com células WT:

- Na morfologia do vacúolo parasitóforo do *T. cruzi*;
- Na adesão celular do *T. cruzi*;
- No fenótipo dos parasitos originados nestas células.





## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Cultivo da linhagem celular LLC-MK2**

Culturas de células LLC-MK2, uma linhagem de células epiteliais extraídas de rim de macaco (Hull, Cherry et al. 1962), foram mantidas em laboratório para estabelecimento do ciclo intracelular do *T. cruzi*. Para cultivo da linhagem LLC-MK2, as células foram semeadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium / high glucose -Invitrogen) contendo 4,5g/L de glicose, 200mM de Glutamina e suplementado com 10% de soro fetal bovino, além de 50 unidades de penicilina e 50µg de streptomicina por litro de meio (DMEM 10%). Depois de semeadas, as células foram mantidas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> pelo período de uma semana até o momento da infecção com o parasito ou repique para manutenção da linhagem. Para o repique o meio das garrafas foi descartado, a monocamada celular lavada com Tampão salina/fosfato (PBS - Phosphate Buffered Saline), pré-aquecido à 37°C. Após a lavagem, foi adicionado um volume de tripsina (Trypsin-EDTA 0.05% - Invitrogen), correspondente a 10% do volume de meio inicial da garrafa. Em seguida, as mesmas foram incubadas por aproximadamente 3 minutos em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para ação da enzima. Após esse período, foi adicionado DMEM 10% para inativação da enzima e as células em suspensão foram repassadas na proporção de 1:10 ou 1:20 (suspensão célula : meio de cultura) para uma nova garrafa.

### **4.2. Cultivo de fibroblastos**

Os fibroblastos utilizados neste estudo foram preparados a partir de embriões de camundongos C57BL6 tipo selvagem (WT), deficientes para LAMP-2 (KO-L2) ou deficiente

para ambas isoformas de LAMP (KO-L1/2). Estes fibroblastos foram isolados e espontaneamente imortalizados em cultura pelo grupo do Professor Paul Saftig (Biochemisches Institut/Christian-Albrechts-Universität Kiel, Alemanha) e gentilmente cedidas para este estudo.

Uma monocamada subconfluente de cada uma das linhagens (WT, KO-L2 ou KO-L1/2) foi mantida em garrafas de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup>, em meio DMEM 10%. Para tal, as células foram semeadas e mantidas em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem uma confluência entre 80%-90%, quando foram repicadas e semeadas em novas garrafas na proporção de 1:10 (como descrito no item 4.1) ou semeadas em lamínulas, para a realização dos ensaios propostos.

#### **4.3. Manutenção da cepa Y de *T. cruzi* e produção de formas tripomastigotas do parasito**

Formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y foram obtidas por manutenção do ciclo intracelular do parasito em células LLC-MK2 como descrito anteriormente (Andrade e Andrews 2004). Para isto, células LLC-MK2 previamente semeadas (como descrito no ítem 4.1) foram expostas a 3x10<sup>6</sup> formas tripomastigotas purificadas (ver purificação abaixo), previamente ressuspensas em meio DMEM 2%, durante aproximadamente 48hs. Após este período, as células foram lavadas e mantidas no mesmo meio DMEM sem parasitos em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por mais 120horas, com trocas de meio a cada 48horas. Completada as 120hs, o meio das células contendo as formas tripomastigotas liberadas foi coletado, centrifugado e logo após incubado à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas.. O sobrenadante contendo as formas tripomastigotas purificadas foi coletado e os parasitos contados em câmara de Neubauer para posterior infecção em células LLC-MK2 e

manutenção do ciclo intracelular do parasito ou utilizado para os ensaios de infecção em fibroblastos selvagens ou deficientes para LAMP-2 ou LAMP-1/2.

Alternativamente, para alguns dos ensaios, os parasitos foram produzidos pela infecção em fibroblastos WT, KO-L2 ou KO-L1/2, utilizando o mesmo protocolo descrito para as células LLC-MK2.

#### **4.4. Infecção celular de *T. cruzi* em fibroblastos WT, KO-L1 e/ou L2 – ensaios de invasão e multiplicação intracelular**

Fibroblastos WT, KO-L1/2 e KO-L2 foram plaqueados, separadamente, em placas de 24 poços, 24 horas antes da exposição às formas tripomastigotas purificadas de *T. cruzi* da cepa Y (provenientes de culturas de LLC-MK2 ou fibroblastos WT, KO-L2 ou KO-L1/2). Sendo que, para os ensaios de invasão foram plaqueados  $4,0 \times 10^4$  células por poço, enquanto, para o de multiplicação intracelular  $2,5 \times 10^4$  células por poço. A exposição aos parasitos foi realizada, com uma MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 100 para ensaios de invasão e 50 para os de multiplicação, por 20 minutos à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram lavadas com PBS suplementado com Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup> (PBS+/+) aquecido a 37°C, para a retirada dos parasitos não internalizados. Em seguida as amostras foram, fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA 4 %), por aproximadamente 24hs, à 4°C para posterior marcação (ensaio de invasão) ou re-incubadas em meio DMEM 10% sem parasito por diferentes tempos (24, 48 ou 72 horas – ensaio de multiplicação intracelular) e então fixadas com PFA 4 %.

As amostras fixadas nos diferentes tempos foram avaliadas através de microscopia de fluorescência de acordo com protocolo previamente descrito (Andrade e Andrews 2004). Para os ensaios de invasão celular, as lamínulas contendo as células aderidas foram retiradas do fixador e lavadas por três vezes com PBS+/+ e em seguida, foram incubadas durante 20min

em PBS contendo 2% de Soro-albumina Bovina (BSA - Bovine Serum Albumine – Invitrogen), PBS-BSA. Logo após, para a identificação dos parasitos extracelulares remanescentes, as lamínulas foram incubadas por 50 minutos 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, lavadas por 4 vezes com PBS-BSA e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 546 (Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes) numa diluição de 1:500 em PBS-BSA, por 40 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS-BSA por 3 vezes e com PBS<sup>+/+</sup> por mais 3 vezes. Depois disso, o DNA da célula hospedeira e do parasito foram marcados por incubação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole - Invitrogen) diluído 1:1000 em PBS<sup>+/+</sup> durante 1 minuto. Após esta etapa, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS<sup>+/+</sup> e montadas sobre lâmina para microscopia com gel de montagem (PPD -p-Fenilenodiamina 0,1% em solução de glicerol:Tris1,5M – 9:1).

Após a montagem as lâminas foram levadas para o microscópio de Fluorescência (Olympus BX51) onde foram contados aproximadamente 15 campos por lamínula, garantindo a contagem de um número mínimo de 250 células. As imagens foram adquiridas usando o *software Image Pro Express (Media Cybernetics)* e a câmera OLYMPUS Q-Color3.

#### **4.5. Avaliação do recrutamento de lisossomos e escape do vacúolo parasitóforo**

Para a avaliação do recrutamento de lisossomos durante a formação do vacúolo parasitóforo, bem como o tempo de escape deste vacúolo nos diferentes tipos celulares,  $4,0 \times 10^4$  fibroblastos WT e KO-L2 foram plaqueados, separadamente, em placas de 24 poços sobre lamínulas redondas de vidro, 24 horas antes da exposição às formas tripomastigotas purificadas de *T. cruzi* da cepa Y (provenientes de LLC-MK2). A exposição aos parasitos foi

realizada como descrito no item 4.4. Após a infecção, as células foram lavadas para a remoção do excesso de parasitos não internalizados. Parte das células foram fixadas em PFA 4% e outra parte re-incubada em DMEM 10% novo e sem parasito por mais 1, 4, 8, 12 e 24 horas, até a fixação. Em seguida, as células foram avaliadas por microscopia de fluorescência de acordo com protocolo descrito no item 4.4, com algumas alterações. Após a marcação dos parasitos extracelulares com anti-*T. cruzi* e secundário marcado com Alexa-Fluor 546, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-BSA e incubadas por 20 minutos com solução PBS-BSA adicionado de saponina 0,5% (PBS-BSA-saponina). A saponina foi adicionada para permitir a permeabilização das membranas celulares e possibilitar a detecção intracelular da proteína de membrana lisossomal, LAMP-1, nas células WT ou KO-L2 e confirmação da sua ausência nas células KO-L1/2. Logo após a incubação, as lamínulas foram incubadas por 45 minutos com o anticorpo monoclonal de rato, específico para LAMP-1 de camundongo, preparado a partir do sobrenadante do hibridoma 1D4B (Hybridoma Bank), numa diluição de 1:100 em PBS-BSA-saponina. Seguida esta incubação, as células foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-BSA-saponina e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de rato marcado com Alexa-Fluor 488 (Alexa 488 goat anti-rat IgG, Molecular Probes) diluído 1:250 em PBS-BSA-saponina. Depois de removido o anticorpo secundário, as lamínulas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS-BSA-saponina e coradas com DAPI, montadas em laminas de vidro e analisadas em microscópio de fluorescência, como descrito anteriormente.

#### **4.6. Análise da morfologia do vacúolo parasitóforo em células WT, KO-L1 e/ou L2**

Para a avaliação da morfologia do vacúolo parasitóforo  $9,0 \times 10^5$  fibroblastos WT, KO-L1/2 e KO-L2 foram plaqueados, separadamente, em placas de cultura de 100 mm, 24 horas antes da exposição às formas tripomastigotas purificadas de *T. cruzi* da cepa Y (provenientes

de LLC-MK2). A incubação com os parasitos foi realizada com uma MOI de 100 parasitos por 40 minutos a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram lavadas com PBS+/- a 37°C e em seguida re-incubadas em meio DMEM 10% sem parasito por mais 20 minutos, quando então foram fixadas em glutaraldeído a 2,5 % diluído em tampão PHEM 0,1M e pH 7,2 Pipes (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) + Hepes (4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid) + Ethylene Glycol Tetraacetic Acid + MgCl<sub>2</sub>) e assim mantidas a 4°C por alguns dias até o processamento. No momento do processamento elas foram lavadas apenas com o tampão PHEM 0,1M e raspadas. O raspado foi recolhido em microtubos, centrifugados e incubados em tampão PHEM e depois Incluídos em agarose *low melting* a 3%. A agarose endurecida contendo as amostras incluídas foi partida em pequenos pedaços, colocadas nos microtubos e lavadas 3 vezes com tampão PHEM 0,1M. Logo após foram marcadas com tetróxido de ósmio a 2% reduzido com ferrocianeto de potássio a 1,5% em tampão PHEM 0,1M (chamado de ósmio reduzido) por uma hora em temperatura ambiente. A desidratação foi realizada com álcool 35%, 50%, 70%, 85% e 95% (2 vezes cada por 10 min), álcool absoluto (3vezes por 10 min) e acetona ( 2 vezes por 20 min). Para a inclusão com em (dentro da) araldite foram usadas as seguintes soluções respeitando a sequência citada: 1 parte de acetona : 1 parte de araldite por 1hora; 1 parte de acetona : 3 partes de araldite (*overnight*); 1 parte de acetona : 4 partes de araldite por 1 hora e enfim, araldite pura por 1 hora à temperatura ambiente e 48 horas à 60°C. Os blocos endurecidos foram desbastados, para retirada do excesso de resina, e cortados no micrótomo. Depois do corte fino no micrótomo fez-se a pirâmide nos blocos, seguida pelo corte ultrafino, onde se obtêm seções de 30nm de espessura. Estas foram postadas em tela de cobre de 200 *mesh*, contrastadas pelo citrato de chumbo e analisadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120 kV. O processamento, o corte e a obtenção das imagens foram realizados no Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG. As

análises morfométricas posteriores foram feitas obtendo-se a razão entre a área total do vacúolo e a área correspondente ao espaço entre a membrana do vacúolo e do parasito, utilizando-se o *software Image J*.

#### **4.7. Avaliação da taxa de exocitose lisossomal em células WT, KO-L1 e/ou L2**

Os ensaios de exocitose lisossomal foram realizados conforme descrito anteriormente (Hissa, Duarte et al. 2012). Brevemente, células plaqueadas 24 horas antes em placas de 24 poços foram incubadas com em meio DMEM sem soro, contendo ou não ionomicina (uma droga que forma poros na membrana, permitindo a passagem de íons cálcio do meio extracelular para o meio intracelular) nas concentrações de 5 ou 10 $\mu$ M, por 10 minutos em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação com a droga, os sobrenadantes foram recolhidos e as células lisadas com solução detergente contendo Triton X-100 (Sigma-Aldrich ®) a 1% em PBS. Tanto o meio extracelular coletado quanto o lisado celular foram incubados com 50  $\mu$ L do substrato da enzima  $\beta$ -hexosaminidase: 6 mM de 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide (Sigma- Aldrich ®), dissolvido em tampão citrato (pH 4.5). As reações foram paralisadas com a adição de 100  $\mu$ L de solução contendo 2,0 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O e 1,1 M de glicina. Os produtos da reação foram lidos em espectrofluorímetro Synergy 2 (365 nm/ 450 nm- comprimentos de onda de excitação e de emissão, respectivamente). Os resultados foram expressos como sendo a porcentagem de enzima detectada no sobrenadante com relação à quantidade total de enzima presente.



#### 4.8. Ensaios de adesão celular do *T. cruzi*

Os ensaios de adesão de formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram realizados segundo protocolo descrito anteriormente (Schenkman, Diaz et al. 1991), Para isso fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 previamente plaqueados em placas de 24 poços, sobre lamínulas redondas de vidro, foram lavados 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 minutos à 4°C. Seguindo esta etapa, as células foram lavadas em PBS e permaneceram, por pelo menos 24 horas, em solução de etanolamina a 0,16 M, pH 8,3. Após este passo, as células foram lavadas em PBS por três vezes e em DMEM/ BSA 0,2% por uma vez. Tripomastigotas, já purificados, provenientes de células LLC-MK2, foram ressuspendidos em DMEM/ BSA 0,2% e incubados, por 40 minutos numa MOI de 50 parasitos por células, com os fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2. Alternativamente, tripomastigotas purificados, provenientes de células WT, KO-L2 ou KO-L1/2 foram ressuspendidos em DMEM/ BSA 0,2% e incubados com os fibroblastos WT, por 40 minutos numa MOI de 50. Após a incubação, os tripomastigotas foram retirados 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 visualização da adesão do *T. cruzi*.

#### 4.9. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste T Student. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ensaio de invasão celular em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 expostos aos tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Com o objetivo de avaliar a influência das isoformas de LAMP na invasão celular pelo *T. cruzi*, foram realizados ensaios utilizando fibroblastos WT, KO-L1/2 e KO-L2. A presença ou ausência de LAMP-2 ou LAMP-1 e 2 foi previamente confirmada por ensaio de imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais para LAMP-1 ou LAMP-2 de camundongo (Figura 5). Células WT foram marcadas com ambos os anticorpos, enquanto células KO-L1/2 não foram marcadas com nenhum dos anticorpos. Por outro lado, células deficientes para a proteína LAMP-2 foram marcadas apenas com anticorpos anti-LAMP-1.

Para os ensaios de invasão, fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 foram plaqueados em placa de vinte e quatro poços, em uma concentração de  $4 \times 10^4$  células por poço. Vinte e quatro horas após a semeadura, as monocamadas foram expostas por 20 minutos às formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, produzidas por cultura de LLC-MK2. Após este período, as monocamadas foram lavadas com PBS +/+, fixadas em paraformaldeído a 4% e processadas para imunofluorescência como descrito na metodologia.

Devido ao DAPI se ligar fortemente à molécula de DNA, ele também marca o cinetoplasto do parasito, pois este contém grande quantidade de DNA. Por isso visualizamos no parasito o cinetoplasto, de tamanho menor e esférico, típico da forma tripomastigota, e o núcleo, de tamanho maior e forma ovalada, sendo este menos evidente que o cinetoplasto.

Em acordo com resultados prévios do nosso grupo (Albertti, Macedo et al. 2010), observamos que a taxa de invasão celular, avaliada pelo número de parasitos intracelulares por 100 células totais ou pelo número de células infectadas por 100 células totais, foi menor

em células KO-L1/2 quando comparado às células WT (Figura 6). Em células WT observamos que o número de parasitos intracelulares por 100 células totais foi três vezes maior em comparação com células KO-L1/2 (Figura 6D). Em relação ao número de células infectadas, WT mostrou uma taxa quase 2,5 vezes maior quando comparado com células KO-L1/2 (Figura 6E). Também foi possível observar que células deficientes para LAMP-2 apresentaram perfil de invasão celular semelhante às células KO-L1/2 (Figura 6). Nessas células observamos um número 3 vezes menor de parasitos intracelulares por 100 células (Figura 6D) e 2,5 vezes menor de células infectadas por 100 células totais (Figura 6E). Estes resultados sugerem que a ausência da proteína LAMP-2 é suficiente para reduzir a entrada dos parasitos na célula.

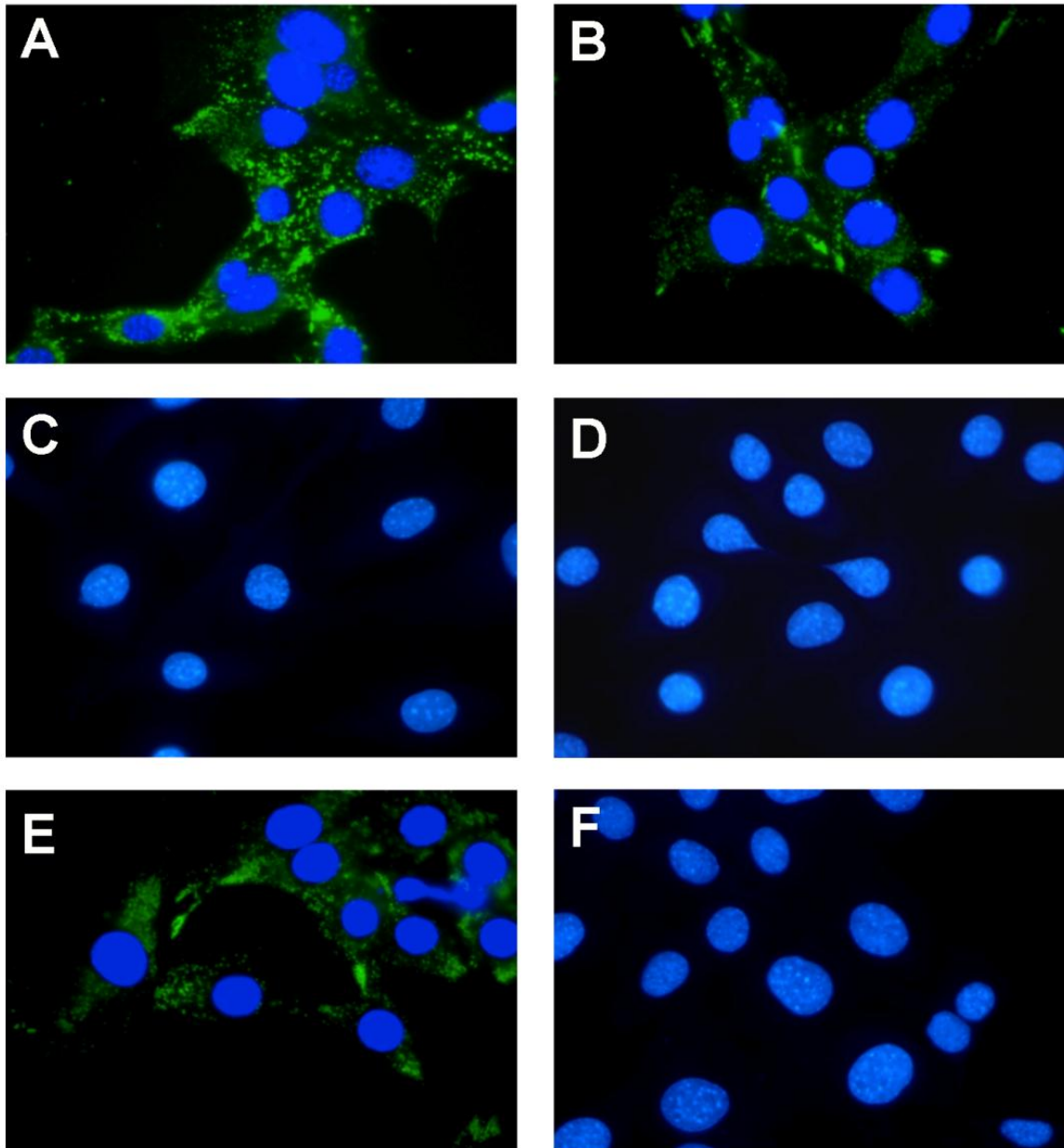


Figura 6 - Fenotipagem dos fibroblastos. Detecção por imunofluorescência de LAMP-1 (A, C e E) e LAMP-2 (B, D e F) em células WT (A e B), KO-L1/2 (C e D) e KO-L2 (E e F). Em azul podemos observar os núcleos celulares marcados com DAPI e em verde os lisossomos marcados pelos anticorpos anti-LAMP-1 ou anti-LAMP-2.

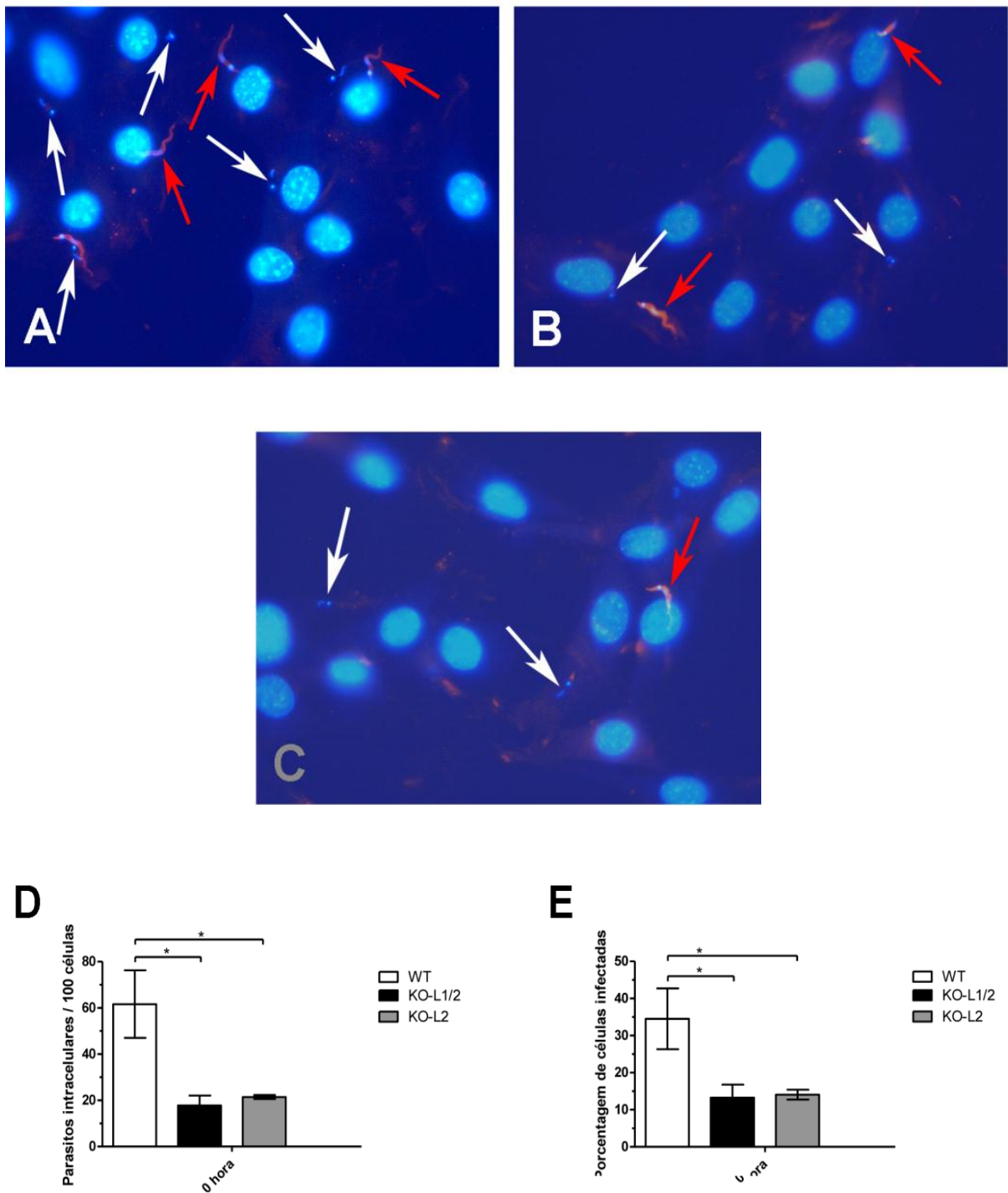


Figura 7 - A ausência de LAMP-2 é suficiente para diminuir a entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira. Fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 foram expostos a formas tripomastigotas do *T. cruzi* por 20 minutos e fixados imediatamente após a exposição. (A-C) Imagens representativas de fibroblastos WT (A), KO-L2 (B) e KO-L1/2 (C) fixados logo após a exposição às formas tripomastigotas de *T. cruzi* (0h). Núcleo e cinetoplasto de todos os parasitos e fibroblastos estão marcados em azul pelo DAPI e parasitos extracelulares aparecem marcados também em vermelho. (D e E) Análise quantitativa da taxa de invasão do *T. cruzi* nos diferentes tipos celulares (WT, KO-L2 e KO-L1/2), avaliado pelo número de parasitos intracelulares por 100 células totais (D) ou pelo número de células infectadas por 100 células totais (E). Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , teste T Student). Esses dados correspondem à média de triplicatas  $\pm$  desvio-padrão.

## 5.2. Ensaios de exocitose de lisossomos em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2

Sabe-se que a exocitose lisossomal é essencial para a internalização do parasito na célula hospedeira. Foi demonstrado recentemente na literatura que a exocitose de lisossomos leva a uma endocitose compensatória, capaz de dirigir a entrada do *T. cruzi* para a célula hospedeira. Também foi mostrado na literatura que a fusão de lisossomos com vesículas fagocíticas é deficiente, tendo sido sugerido um comprometimento de mobilidade dos lisossomos nessas células (Albertti, Macedo et al. 2010). Sendo assim, decidimos investigar se havia algum comprometimento na capacidade exocítica dos lisossomos nas células KO-L2 e KO-L1/2 que pudesse justificar uma diminuição na taxa de invasão celular pelo *T. cruzi* nessas células. Para tal, realizamos ensaios de exocitose lisossomal através da medida da atividade da enzima lisossômica  $\beta$ -hexosaminidase no sobrenadante de células tratadas com ionomicina. A ionomicina é uma droga que forma poros em membranas e permite o influxo de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular. O aumento de cálcio no citoplasma das células é então capaz de desencadear a exocitose de lisossomos.

Para os ensaios, os diferentes fibroblastos foram plaqueados 24 horas antes, em placas de 24 poços e incubadas ou não com 5 ou 10 $\mu$ M de ionomicina em meio DMEM, por em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação com o ionóforo, os sobrenadantes foram recolhidos e as células lisadas para avaliação da atividade da  $\beta$ -hexosaminidase. Os dados obtidos mostram que todas as células foram capazes de reagir ao estímulo da ionomicina, liberando conteúdo lisossomal no sobrenadante das culturas (Figura 7). Não só as células foram capazes de responder ao estímulo da ionomicina, mas foi observada também a mesma taxa de exocitose lisossomal das células KO-L2 e KO-L1/2 em relação às células WT, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as células. Isso foi observado nas duas concentrações de ionomicina testadas (5 e 10  $\mu$ M).

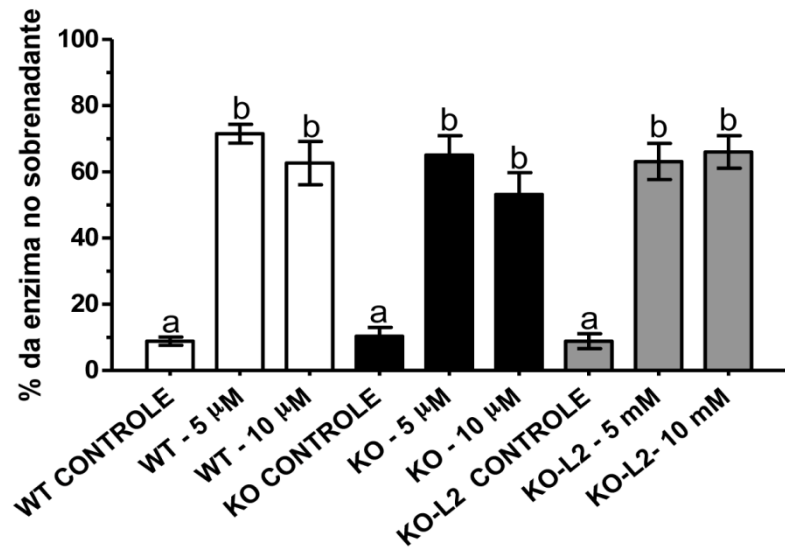


Figura 8 - A ausência de LAMP não altera a taxa de exocitose lisossomal estimulada por tratamento com Ionomicina. Fibroblastos WT, KO-L1/2 (KO) e KO-L2 foram tratados por 10 minutos com 5 ou 10mM de Ionomicina. Após o tratamento, tanto o meio extracelular quanto o produto do lisado celular foi coletado e usado para a medição da atividade da enzima  $\beta$ -hexosaminidase, uma enzima residente em lisossomos. Os valores representam a porcentagem da enzima  $\beta$ -hexosaminidase no sobrenadante de culturas de fibroblastos em relação à quantidade total da enzima ( $\beta$ -hexosaminidase no sobrenadante  $\times$  100 /  $\beta$ -hexosaminidase no sobrenadante +  $\beta$ -hexosaminidase no lisado celular). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras ( $P < 0,05$ , test T Student). Os dados foram representados como média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão. Esses dados correspondem à média de triplicatas  $\pm$  desvio-padrão.



### 5.3. Ensaio de adesão celular em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 expostos aos tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* isolados de células LLC-MK2

Além da exocitose lisossomal, a taxa de adesão de parasitos à superfície da célula hospedeira é importante para o processo de internalização do parasito (Schenkman, Diaz et al. 1991). Sendo assim, decidimos investigar se a ausência de LAMP de alguma forma contribuiria para uma menor adesão dos parasitos à superfície celular. Assim, realizamos ensaios de adesão celular de formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas de culturas de células LLC-MK2 em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2. Para isso, os fibroblastos foram semeados em placa de vinte e quatro poços, em uma concentração de  $4 \times 10^4$  células por poço. Vinte e quatro horas após a semeadura as células foram fixadas com glutaraldeído 2% (Sigma-Aldrich®) em PBS+/+ e logo depois mantidas em solução de etanolamina por 24 horas à 4°C. Após este passo as células foram lavadas e incubadas por 40 minutos com as formas tripomastigotas da cepa Y com uma MOI de 50. Após a incubação, os tripomastigotas foram retirados, as células lavadas para a remoção dos parasitos não aderidos e novamente fixadas com Bouin e coradas com Giemsa.

Os dados obtidos mostram que células WT apresentam uma taxa de adesão maior do que aquela observada para células KO-L1/2 e KO-L2 (Figura 8 A-C). As células WT apresentaram uma taxa de adesão de parasitos em torno de 20 parasitos por 100 células, já as células KO-L1/2 e KO-L2 apresentaram uma taxa de adesão celular em torno de 7 parasitos por 100 células (Figura 8 D). Isso mostra que a taxa de adesão para células deficientes na proteína LAMP é em torno de 3 vezes menor que aquela observada para células WT. Esses dados mostram que a ausência de LAMP de alguma forma interfere com a adesão do parasito na célula e que ausência de apenas LAMP-2 é capaz de reproduzir o fenótipo observado para células deficientes em ambas as isoformas de LAMP.

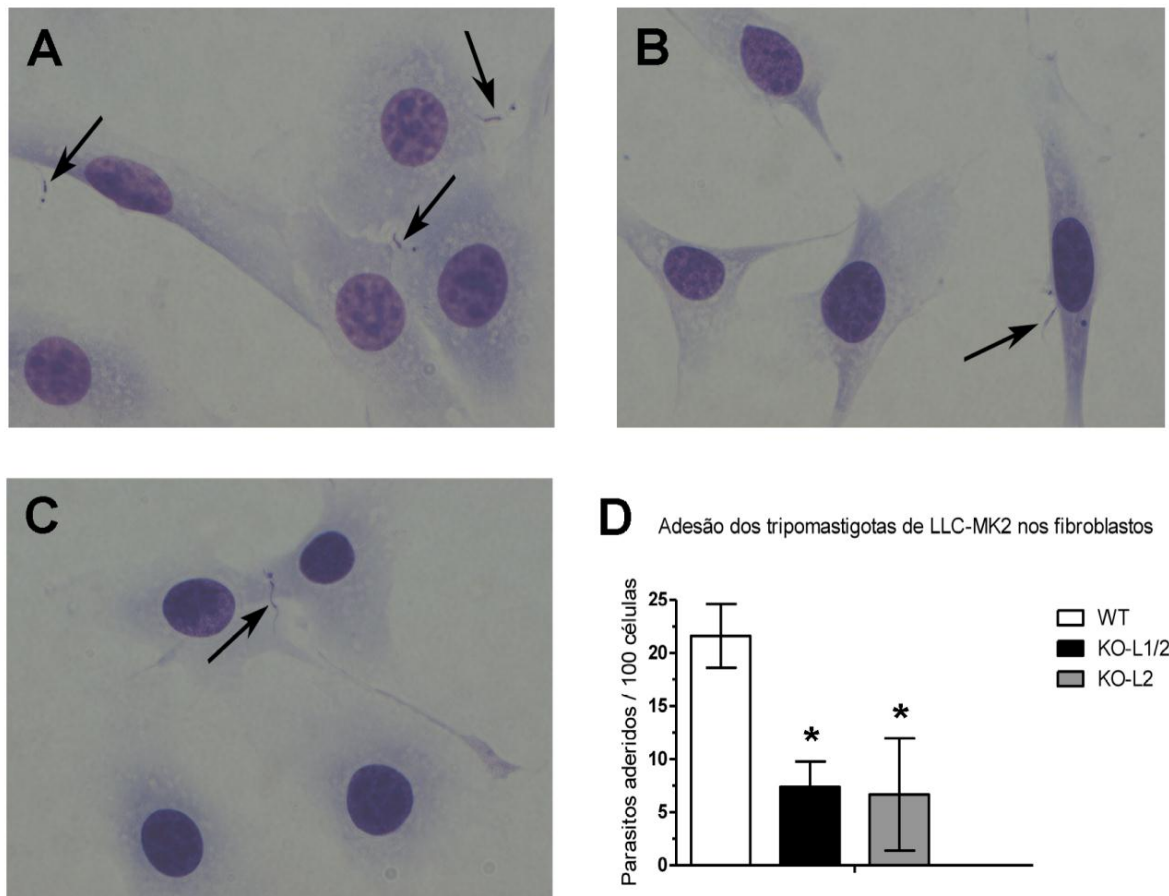


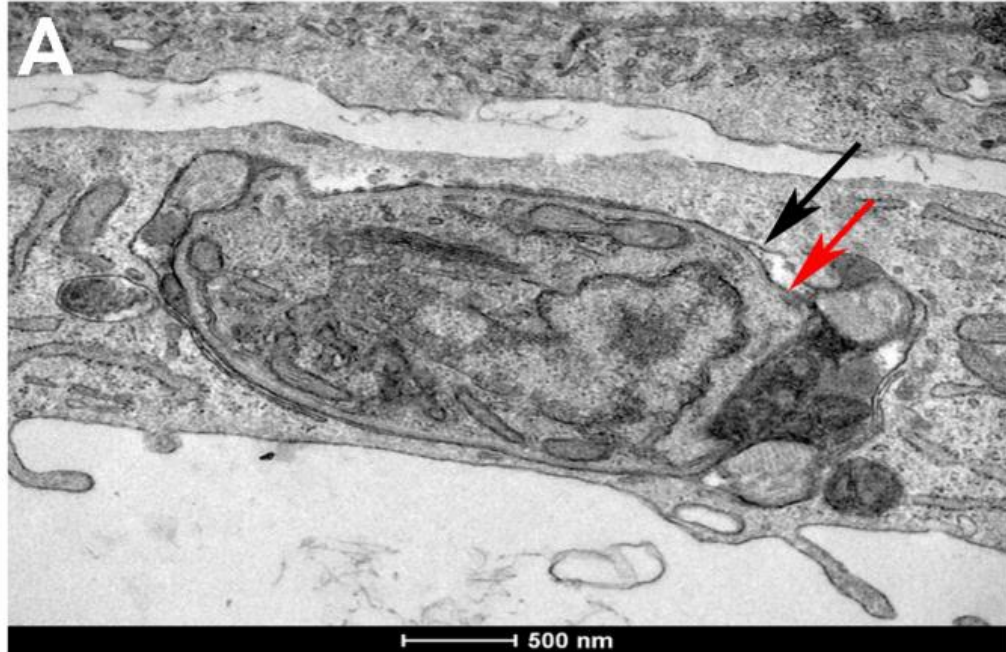
Figura 9 - A adesão dos tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* é afetada pela ausência celular de LAMP-2. Fibroblastos WT, KO-L1/2 e KO-L2 foram pré-fixados com glutaraldeído a 2% em PBS por 5 minutos, a 4°C. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS+/+ e incubadas, por 24 horas, com etanolamina 0,16 M (pH 8,3) a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e com DMEM/ BSA 0,2% e foram submetidas ao contato com as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, MOI 50, por 40 minutos, fixadas com Bouin e marcadas para visualização dos parasitos aderidos. (A-C) Imagens representativas de parasitos aderidos (seta) em células WT (A), KO-L1/2 (B) e KO-L2 (C). (D) Quantificação de parasitos aderidos para cada 100 células contadas. Os dados são mostrados como sendo a média de triplicadas  $\pm$  desvio padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle – WT ( $P < 0,05$ , teste T Student).

#### **5.4. Avaliação da morfologia do vacúolo parasitóforo em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 expostos aos tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* originados de cultura de células LLC-MK2**

Como LAMP-1 e 2 são as proteínas presentes em maior quantidade em lisossomos e mais sialiladas, decidimos estudar se elas poderiam estar contribuindo para adesão do parasito na célula através de suas modificações glicídicas, mais especificamente através do ácido siálico. Segundo dados publicados na literatura, a presença de ácido siálico na célula hospedeira é importante para a formação de um vacúolo parasitóforo com membrana intimamente justaposta à membrana do parasito (Lopez, Huynh et al. 2002). Provavelmente isso se dá, por propiciar uma maior interação entre a membrana que irá formar o vacúolo parasitóforo, na superfície da célula hospedeira, e a membrana do *T. cruzi*. Na ausência de ácido siálico o vacúolo parasitóforo é largo com pouca interação entre a membrana do vacúolo e membrana do parasito. Dessa forma, avaliamos por microscopia eletrônica de transmissão a morfologia do vacúolo parasitóforo em células WT, KO-L1/2 e KO-L2.

Para isso, fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 foram plaqueados em placa de seis poços, em uma concentração de  $3 \times 10^5$  células por poço. Vinte e quatro horas após a semeadura, as monocamadas foram expostas por 40 minutos à forma infectante da cepa Y, derivada de cultura de LLC-MK2, com uma MOI de 100 e então processadas para microscopia eletrônica. Como esperado, células WT apresentaram vacúolos parasitóforos com membrana intimamente justaposta à membrana do parasito (Figura 9 A). A avaliação dos vacúolos parasitóforos obtidos em células KO-L1/2 ou KO-L2 não apresentaram nenhuma diferença significativa com relação às células WT (Figura 9 A - C), estando suas membranas também intimamente justapostas à membrana do parasito. Análises estatísticas, avaliando a razão entre a área do vacúolo sobre a área do parasito, confirmam estes dados (Figura 9 D)

Isto indica que, embora LAMP-1 e 2 sejam proteínas com alto conteúdo de ácido siálico, sua ausência não interfere com a morfologia do vacúolo.



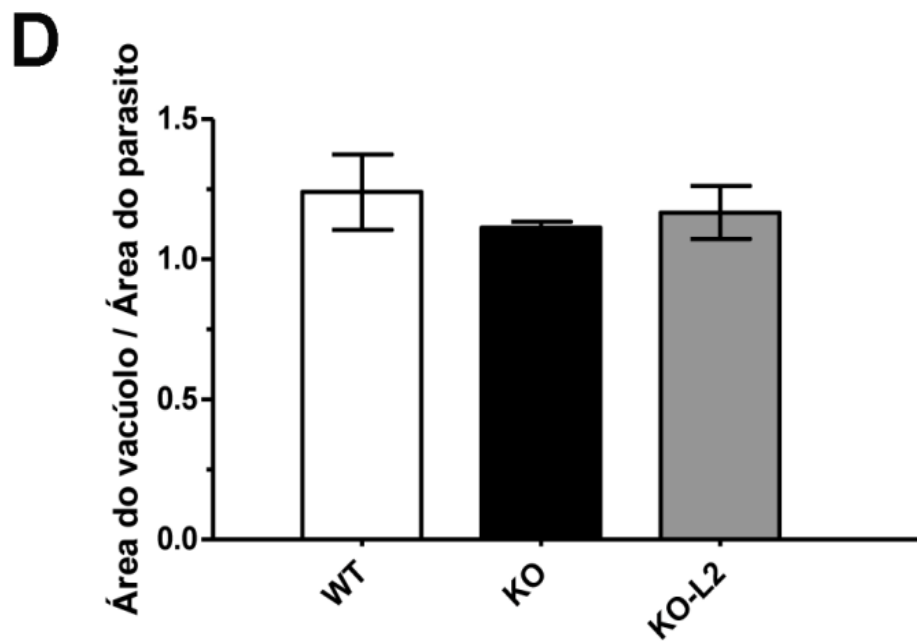
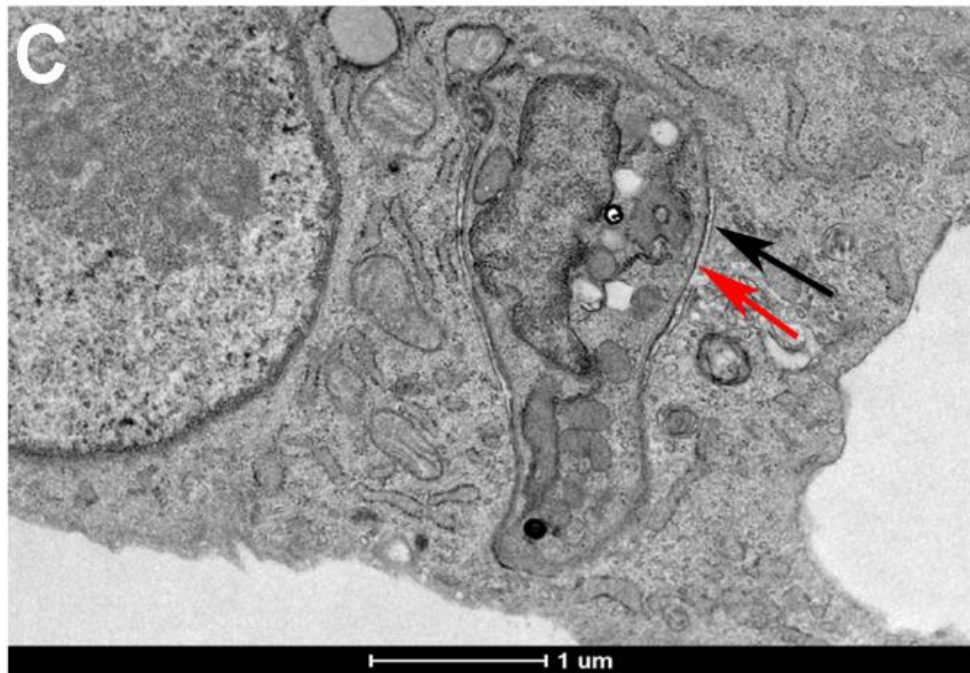


Figura 10 - A ausência de ambas as proteínas LAMP não interfere na morfologia do vacúolo parasitóforo. Análise por microscopia eletrônica de transmissão da morfologia do vacúolo parasitóforo em células WT (A), KO-L1/2 (B) e KO-L2 (C). A seta vermelha indica a membrana do parasito e a preta a do vacúolo parasitóforo. O gráfico mostra a razão entre a área do vacúolo parasitóforo e a do parasito nas três células. Os dados são apresentados pela avaliação de 15 vacúolos para cada tipo celular. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , teste T Student).

### **5.5. Ensaios de multiplicação intracelular em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 infectados com tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi***

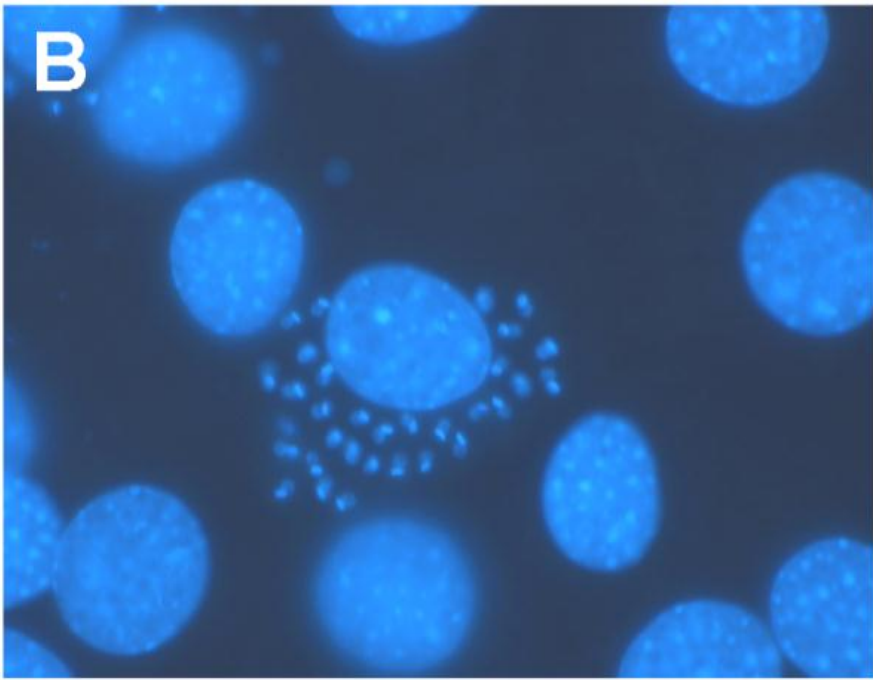
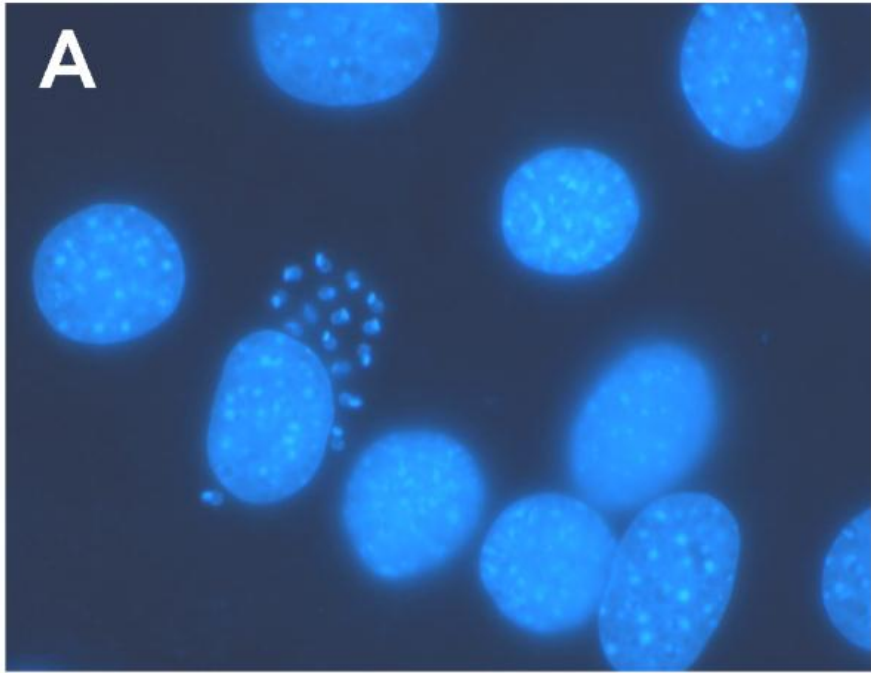
Em trabalho anterior do nosso grupo (Albertti, Macedo et al. 2010) foi demonstrado que, embora a invasão celular pelo *T. cruzi* esteja comprometida em células deficientes para ambas isoformas de LAMP, nessas células o parasito apresenta uma taxa de multiplicação intracelular maior do que aquela observada para as células WT. Uma vez que a ausência de LAMP-2 foi suficiente para reproduzir os dados encontrados para a invasão celular em células KO-L1/2, decidimos avaliar se também a taxa de multiplicação intracelular do parasito estaria alterada apenas na ausência de LAMP-2.

Para isso, fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 foram semeados em placa de vinte e quatro poços, em uma concentração de  $2,5 \times 10^4$  células por poço e infectadas 24 horas depois foram expostas às formas tripomastigotas de *T. cruzi* produzidas em células LLC-MK2. A infecção foi realizada por 20 minutos com uma MOI de 50. Após este período, as monocamadas foram lavadas com PBS +/- e re-incubadas em DMEM por mais 24, 48 ou 72 horas até a fixação e processamento para microscopia de fluorescência. Para isso, as amostras foram marcadas apenas com DAPI que evidencia não só o núcleo do fibroblasto e do parasito, mas também o cinetoplasto em barra, típico da forma amastigota intracelular e replicativa do *T. cruzi*.

Como previamente descrito, células KO-L1/2 apresentaram uma maior taxa de multiplicação intracelular quando comparada com células WT (Figura 10). As imagens representativas mostram claramente um maior número de parasitos intracelulares em culturas de células KO-L1/2, 72 horas após a invasão do parasito, quando comparadas à culturas de WT infectadas, no mesmo tempo (figura 10 A e C). A quantificação do número de parasitos intracelulares por célula infectada confirma estes dados (Figura 10 D). Quarenta e oito horas

após a infecção já é possível observar uma tendência no aumento de parasitos intracelulares por célula infectada nas células KO-L1/2 em relação às células WT. Esta diferença se torna mais clara e significativa 72 horas após a infecção. Ao avaliarmos as células KO-L2 podemos observar que elas novamente apresentam um resultado similar ao das células KO-L1/2 (Figura 10 B e D). Nessas células também encontramos um maior número de parasitos intracelulares ao longo da infecção, assim como observado para as células KO-L1/2. Embora nas células KO-L2 não tenha sido observada uma tendência no aumento do número de parasitos intracelulares em relação as células WT 48 horas após a exposição aos parasitos, observamos claramente um aumento significativo no número de parasitos intracelulares 72 horas após a invasão (Figura 10 D). Este aumento foi estatisticamente igual àquele observado para as células KO-L1/2 em reação às células WT.







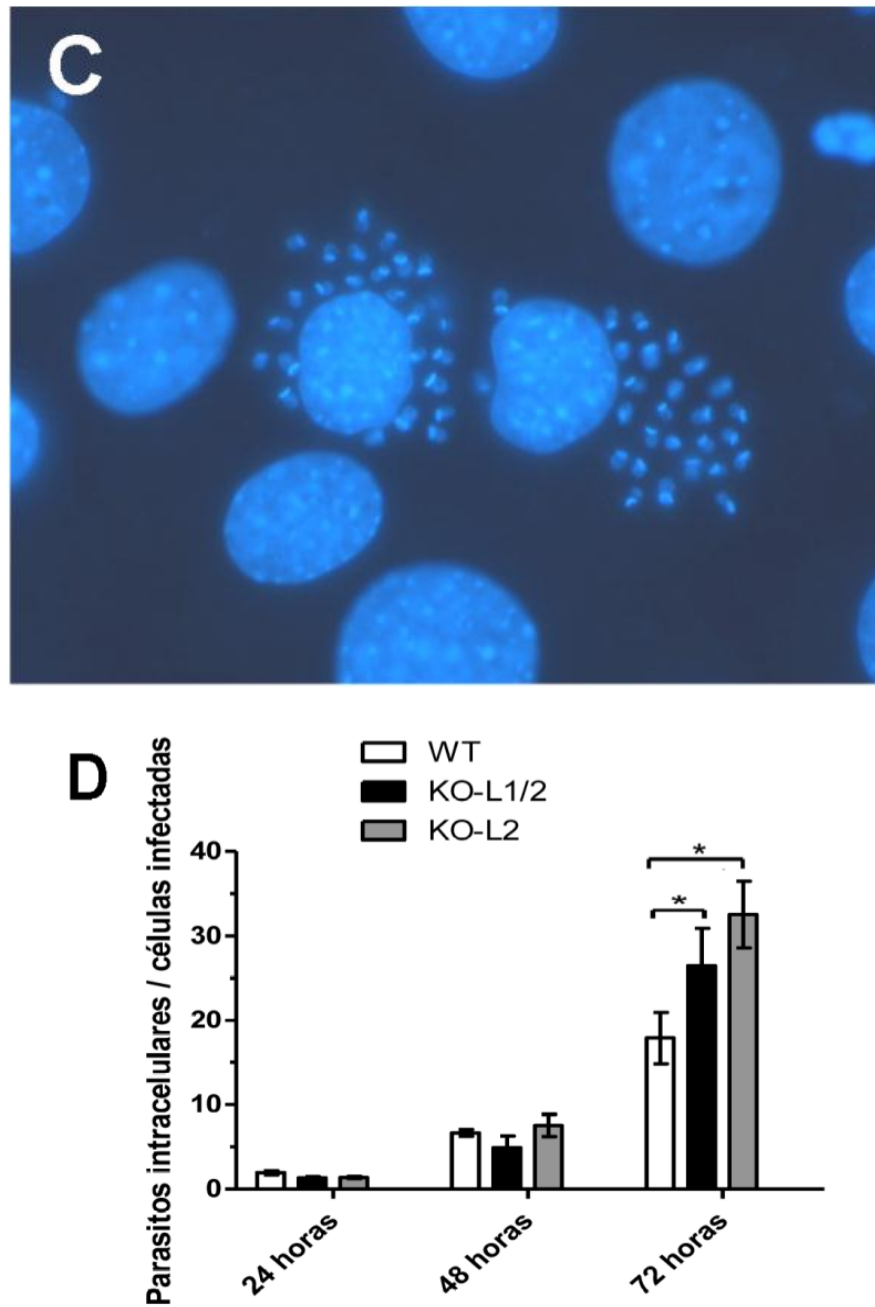


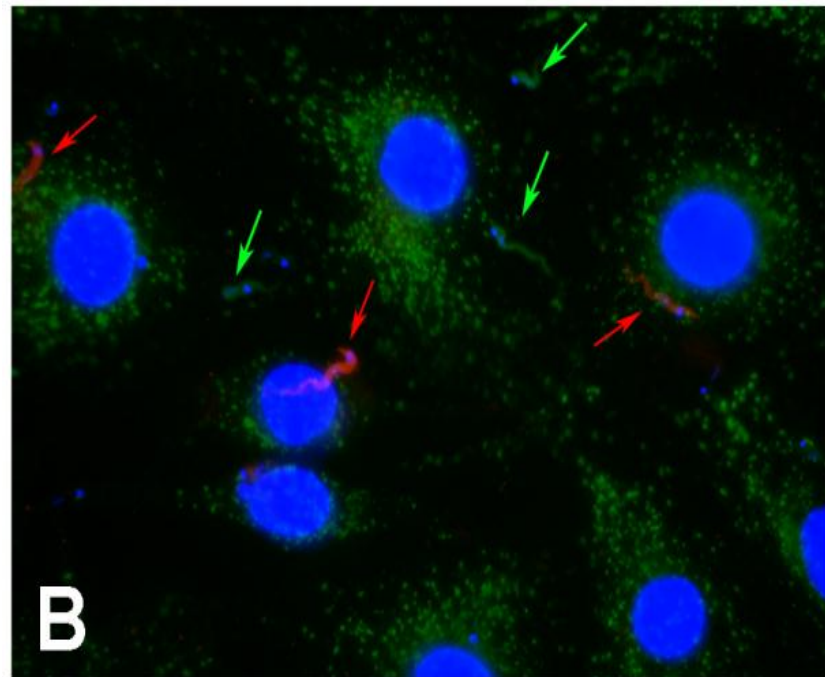
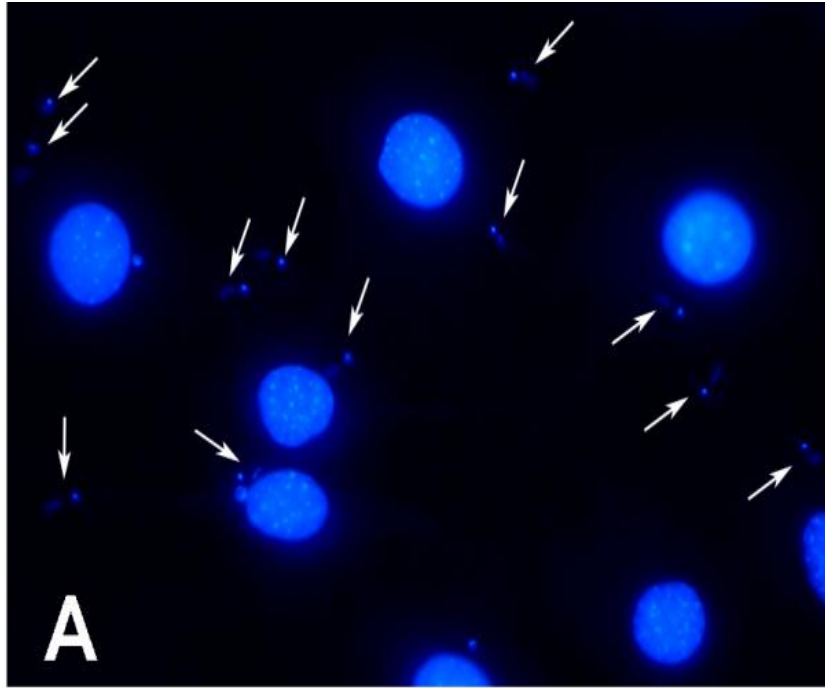
Figura 11 - A ausência de apenas LAMP-2 já é suficiente para induzir uma maior multiplicação intracelular do *T. cruzi*. Fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 foram expostos a formas tripomastigotas do *T. cruzi* por 20 minutos e fixados para análise, 24, 48 ou 72 horas após à exposição. (A-C) Imagens representativas de fibroblastos WT (A), KO-L2 (B) e KO-L1/2 (C) fixados 72 horas após a exposição às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Núcleo e cinetoplasto de todos os parasitos e núcleos de fibroblastos estão marcados em azul pelo DAPI. (D) Análise quantitativa da taxa de multiplicação intracelular do *T. cruzi* nos diferentes tipos celulares (WT, KO-L2 e KO-L1/2), avaliado pelo número de parasitos intracelulares por célula infectadas. Os dados correspondem à média de triplicatas  $\pm$  desvio-padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , teste T Student).

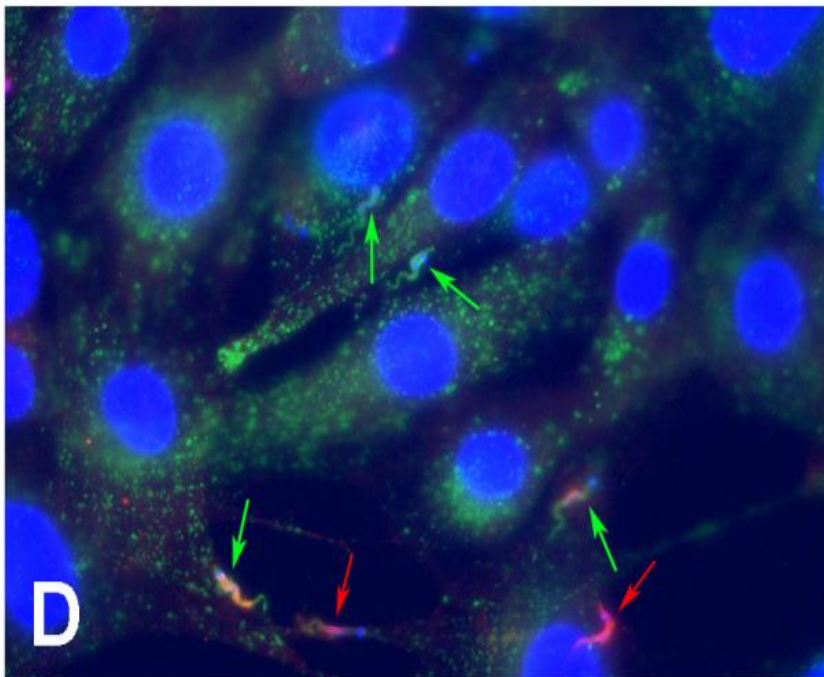
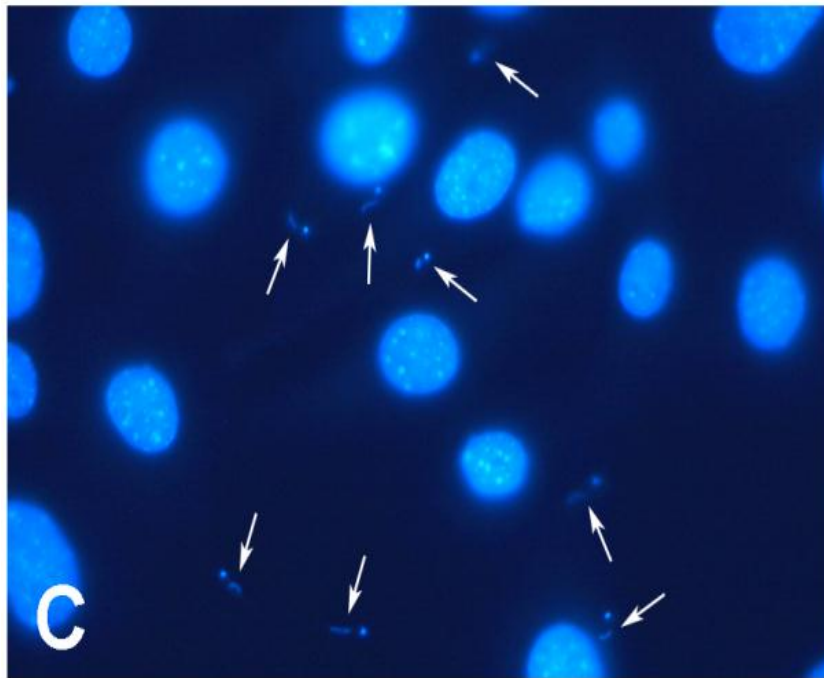
## **5.6. Ensaio de formação e escape do vacúolo parasitóforo em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 infectados com tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi***

Sabe-se que a associação dos lisossomos à membrana plasmática e posteriormente com o vacúolo recém-formado é importante na formação e maturação do vacúolo parasitóforo, além de garantir uma infecção celular viável (Andrade e Andrews 2004, Fernandes, Cortez et al. 2011). Além disso, o escape do vacúolo parasitóforo, após a maturação do vacúolo, é imperativo para garantir a transformação completa da forma tripomastigota, infectiva, na forma amastigota, replicativa, garantido assim a multiplicação intracelular do *T. cruzi*. Uma vez que observamos que em células KO-L1/2 ou KO-L2 há uma maior taxa de replicação, decidimos investigar se esse fenótipo poderia ser consequência de alterações na formação, maturação e/ou escape do parasito de seu vacúolo parasitóforo. Sendo assim, avaliamos o recrutamento de lisossomos durante as primeiras horas após a invasão e infecção celular, bem como a taxa de escape do parasito de seu vacúolo parasitóforo nas horas subsequentes até sua completa exposição ao citoplasma celular. Como o anticorpo padronizado no laboratório para marcação de lisossomos é direcionado para a molécula de LAMP, não pudemos investigar esses parâmetros em células KO-L1/2, apenas nas células WT e KO-L2.

Para isso, fibroblastos WT e KO-L2 foram plaqueados em placa de vinte e quatro poços, em uma concentração de  $4 \times 10^4$  células por poço. Vinte e quatro horas após a semeadura, as monocamadas foram expostas por 20 minutos à forma infectante da cepa Y, derivada de cultura de LLC-MK2, com uma MOI de 100. Após este período, as monocamadas foram lavadas com PBS +/+, para remoção dos parasitos não internalizados, fixadas em paraformaldeído a 4% ou re-incubadas em DMEM por mais 1, 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 horas até a fixação. As amostras foram então processadas e analisadas por microscopia de fluorescência.

A figura 11 mostra a quantidade de parasitos intracelulares que co-localizam com LAMP nos diferentes tempos em células WT e KO-L2. Logo após a invasão, no tempo de 0h, observamos uma diferença estatisticamente significativa entre as células WT e KO-L2 (Figura 11 B e D). Em células WT há cerca de 40% menos parasitos intracelulares que co-localizam com LAMP, indicando que em células KO-L2 o recrutamento inicial de lisossomos para o processo de invasão é mais rápido (Figura 11 E). Nos períodos subsequentes, 1, 4 e 8h, quase todos os parasitos intracelulares estão marcados com LAMP. Embora haja uma tendência a uma menor co-localização de parasitos intracelulares com LAMP, nos tempos de 4 e 8 horas em células KO-L2, não foi observada diferença significativa entre os dois tipos celulares. Nos tempos entre 8 e 12 horas após a invasão observamos um claro declínio do número de parasitos intracelulares que co-localizam com LAMP nos dois tipos celulares, indicando que neste tempo ocorre o escape do vacúolo nessas células. De novo, nenhuma diferença significativa foi observada entre os dois tipos celulares. Nos tempos subsequentes (16, 20 e 24 horas), como esperado, cada vez menos parasitos intracelulares co-localizam com LAMP e nenhuma diferença significativa entre as duas células foi observada. Esses dados indicam que a ausência de LAMP não influencia na maturação e/ou escape do vacúolo parasitóforo de *T. cruzi*.





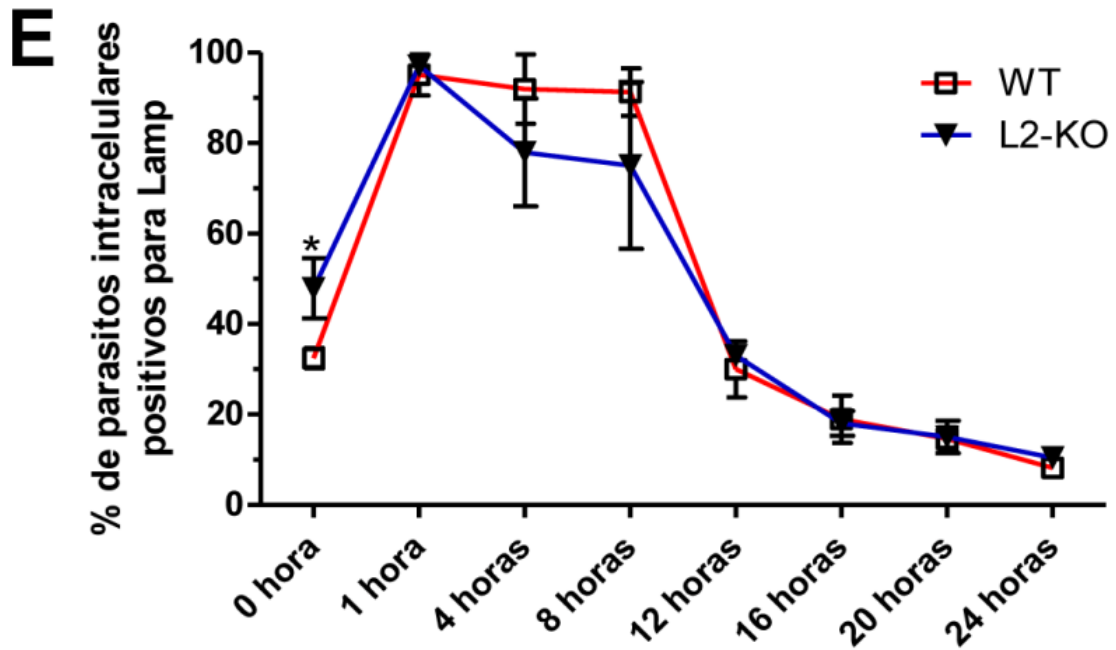


Figura 12 - O recrutamento inicial de lisossomos pelos parasitos é afetado pela ausência de LAMP-2. Fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 foram expostos a formas tripomastigotas do *T. cruzi* por 20 minutos e fixados para análise (0 hora) ou re-incubados por mais 1, 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 horas até a fixação. Imagens representativas de fibroblastos WT (A e B), KO-L2 (C e D) fixados logo após a exposição às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Núcleo e cinetoplasto de todos os parasitos e fibroblastos estão marcados em azul pelo DAPI, parasitos extracelulares são vistos em vermelho e em verde a marcação de lisossomos. As setas brancas indicam parasitos intracelulares sem co-localização com LAMP e em verde os que co-localizam com LAMP. As setas vermelhas indicam os parasitos extracelulares. (E) Análise quantitativa da porcentagem de parasitos intracelulares que co-localizam com LAMP nos dois tipos celulares, WT e KO-L2 ao longo de 24 horas. Os dados correspondem à média de triplicatas  $\pm$  desvio-padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , teste T Student).

### **5.7. Ensaios de invasão e multiplicação celular de formas infectivas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* cultivados em fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2**

Uma vez que observamos diferenças na multiplicação intracelular de *T. cruzi* em células deficientes em LAMP, decidimos investigar se a ausência dessa proteína influenciaria no comportamento de formas tripomastigotas liberadas por essas células. Para isso, utilizamos formas tripomastigotas liberadas pelos diferentes fibroblastos (WT, KO-L1/2 e KO-L2) na infecção de fibroblastos WT e avaliamos a taxa de invasão e multiplicação intracelular desses parasitos.

Fibroblastos WT foram plaqueados em placa de vinte e quatro poços para ensaios de invasão e de multiplicação intracelular do parasito. Vinte e quatro horas após a semeadura, as monocamadas foram expostas à forma infectante da cepa Y derivada de cultura dos fibroblastos WT, KO-L2 ou KO-L1/2. Após esse período, as monocamadas foram lavadas com PBS +/+, fixadas em paraformaldeído a 4% ou re-incubadas em meio por mais 24, 48 ou 72 horas até a fixação. As amostras foram então processadas para imunofluorescência.

No período logo após a exposição aos diferentes tripomastigotas, isolados de WT, KO-L1/2 ou KO-L2 (0h), podemos observar que os fibroblastos WT expostos às formas tripomastigotas obtidas de células KO-L1/2 apresentam uma capacidade diminuída de invasão em relação aos tripomastigotas produzidos em células que possuem LAMP-1 ou ambas as isoformas de LAMP (figura 12 A). Esses resultados indicam que a ausência de LAMP-1 na célula hospedeira altera as formas tripomastigotas produzidas, interferindo com sua capacidade infectiva. Por outro lado, a multiplicação intracelular desses parasitos isolados dos diferentes fibroblastos (WT, KO-L1/2 ou KO-L2) não foi afetada pela ausência de LAMP-1 e/ou 2 na célula de origem dos parasitos (figura 12 B). O número de parasitos intracelulares

ao longo de 72 horas de infecção celular foi o mesmo para células infectadas com tripomastigotas isolados de fibroblastos WT, KO-L1/2 ou KO-L2.

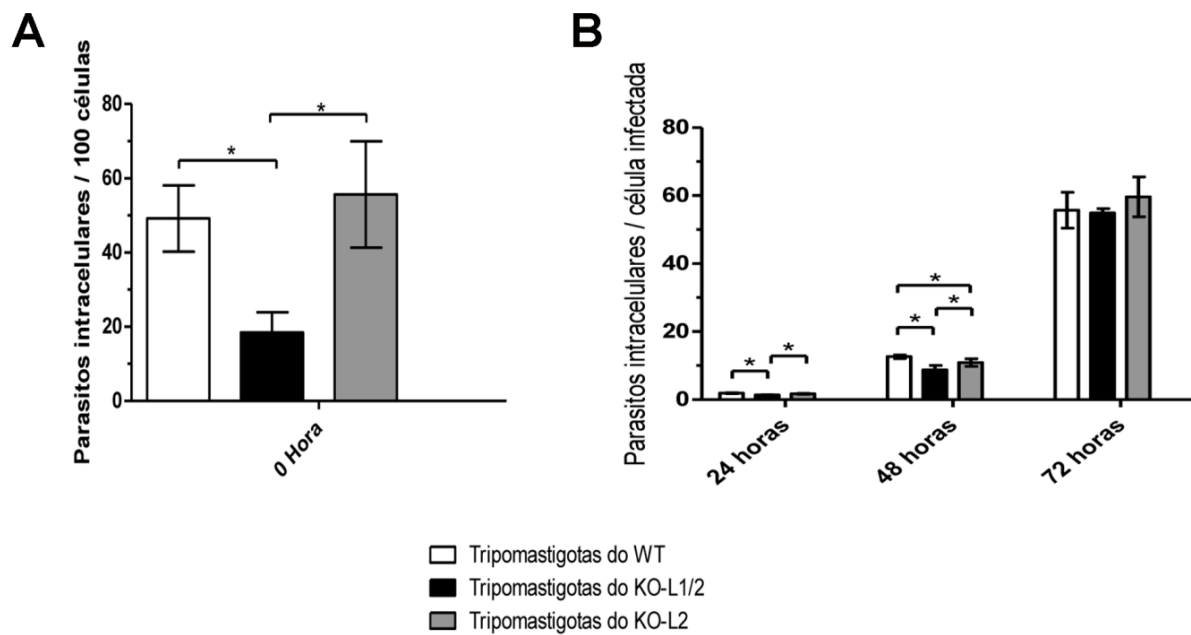


Figura 13 - A passagem por células deficientes em LAMP 1 e 2 produz parasitos com capacidade diminuída de invasão mas não altera a taxa de multiplicação intracelular. Fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2 foram expostos a formas tripomastigotas do *T. cruzi* por 20 minutos e fixados imediatamente (0h) ou 24, 48 ou 72 horas após à exposição. (A) Análise quantitativa da taxa de invasão de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolados de fibroblastos WT, KO-L1/2 ou KO-L2, em fibroblastos WT. A taxa de invasão foi avaliado pelo número de parasitos intracelulares por 100 células totais. (B) Análise quantitativa da taxa de multiplicação intracelular de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, isolados de fibroblastos WT, KO-L1/2 ou KO-L2, em fibroblastos WT, avaliado pelo número de parasitos intracelulares por célula infectada. Os dados correspondem à média de triplicatas  $\pm$  desvio-padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , teste T Student).



### **5.8. Ensaio de adesão celular em fibroblastos WT expostos aos tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* isolados de fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2**

Devido a invasão diminuída dos tripomastigotas provenientes de células deficientes em LAMP-1 e 2, resolvemos investigar se este evento poderia ser consequência de uma menor adesão dos parasitos à superfície celular. Realizamos os ensaios de adesão celular utilizando as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* obtidas de culturas de fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2.

Para isso, fibroblastos WT foram semeados em placa de vinte e quatro poços, em uma concentração de  $4 \times 10^4$  células por poço. Vinte e quatro horas após a semeadura as células foram fixadas com glutaraldeído 2% (Sigma-Aldrich®) em PBS+/+ e logo depois mantidas em solução de etanolamina por 24 horas à 4°C. Após esse passo as células foram lavadas e incubadas por 40 minutos com as formas tripomastigotas a uma MOI de 50. Após a incubação, os tripomastigotas foram retirados, as células lavadas para a remoção dos parasitos não aderidos e novamente fixadas com Bouin e coradas com Giemsa.

Os dados obtidos mostram que parasitos provenientes de células deficientes para LAMP-2 ou ambas as isoformas de LAMP, 1 e 2, apresentam a mesma capacidade de adesão celular observada para os parasitos provenientes de células WT (Figura 13). Todos os tripomastigotas apresentaram taxa de adesão em torno de 22 parasitos por 100 células..

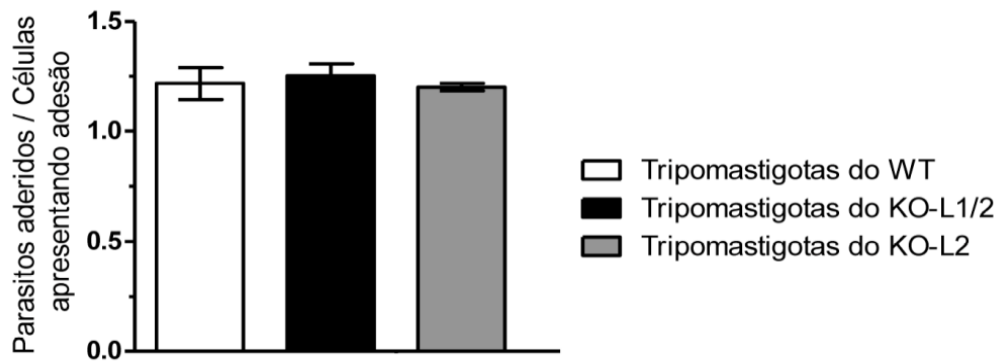


Figura 14 - A passagem por células deficientes em LAMP não altera a capacidade de adesão celular de *T. cruzi*. Fibroblastos WT foram pré-fixados com glutaraldeído a 2% em PBS por 5 minutos, a 4°C. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS+/+ e incubadas, por 24 horas, com etanolamina 0,16 M (pH 8,3) a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e com DMEM/ BSA 0,2% e foram submetidas ao contato com as formas tripomastigotas do *T. cruzi* obtidas de culturas de fibroblastos WT, KO-L2 e KO-L1/2, com uma MOI de 50, por 40 minutos, fixadas com Bouin e marcadas para visualização dos parasitos aderidos. O gráfico mostra a quantificação de parasitos aderidos para cada 100 células contadas. Os dados são mostrados como sendo a média de triplicadas  $\pm$  desvio padrão. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , teste T Student).



## 6. DISCUSSÃO

Para que o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado aconteça, o *Trypanosoma cruzi* obrigatoriamente deve invadir e colonizar a célula hospedeira. Para isso, é necessário que o parasito interaja com a célula propiciando o reconhecimento, adesão e ativação de vias de sinalização, que culminam com sua internalização (revisto por Yoshida e Cortez 2008). Diversos componentes do parasito, bem como receptores presentes na célula alvo, são responsáveis por desencadear as cascatas de sinalização que auxiliam na invasão celular pelo *T. cruzi*. Hoje está bem estabelecido que o processo de invasão envolve o aumento de cálcio citoplasmático na célula hospedeira (Tardieux, Webster et al. 1992), decorrente da ativação das cascatas de sinalização disparadas pelo parasito ou mesmo pelo influxo de cálcio promovido por lesões na membrana plasmática (Dorta, Ferreira et al. 1995, Burleigh, Caler et al. 1997, Scharfstein, Schmitz et al. 2000, Fernandes, Cortez et al. 2011). O aumento de cálcio é um acontecimento importante, pois promove o recrutamento e exocitose de lisossomos no local de adesão do parasito à célula (Fernandes, Cortez et al. 2011). Essa exocitose lisossomal, por sua vez, é o evento desencadeador do processo de internalização do parasito pela célula hospedeira (Tardieux, Webster et al. 1992, Burleigh e Andrews 1995, Fernandes, Cortez et al. 2011). Um fato muito interessante é que os tripomastigotas são internalizados pela célula por sua região posterior em um momento de grande motilidade, indicando que de alguma forma o parasito tem que estar ancorado à membrana da célula hospedeira no momento de sua internalização (Schenkman, Diaz et al. 1991, Fernandes, Cortez et al. 2011). Além disso, já é sabido que o impedimento da fusão lisossomal, no local de adesão do parasito e na formação do vacúolo parasitóforo, inviabiliza a infecção celular por permitir o escape do parasito da célula (Andrade e Andrews 2004). Sendo assim, a membrana lisossomal poderia ter o papel de âncora para o *T. cruzi* na célula hospedeira.

Diante do exposto, nosso grupo resolveu estudar componentes da membrana lisossomal que pudessem funcionar como moléculas de adesão e ancoragem do parasito na célula. Ao se fundir com a membrana celular os lisossomos expõem seu domínio luminal e, conseqüentemente, suas proteínas de membrana, as quais ficam voltadas para a superfície de contato com o parasito. Dentre as proteínas de membrana lisossomal, duas são encontradas em grande abundância, LAMP-1 e LAMP-2. Essas isoformas de LAMP são altamente glicosiladas e ricas em ácido siálico, ambas possuindo grande porção luminal recobrando cerca de 80% da superfície interna da organela (Granger, Green et al. 1990, Fukuda 1991, Eskelinen, Tanaka et al. 2003). Por outro lado, sabe-se que o *T. cruzi* usa o ácido siálico da célula hospedeira para modificar suas proteínas de superfície, uma vez que ele não é capaz de produzi-lo (Schenkman, Pontes et al. 1992, Acosta, Schenkman et al. 1994). Esse processo acontece por ação de uma família de proteínas do parasito, denominadas de trans-sialidases, as quais transferem esse grupamento da célula hospedeira para proteínas de superfície do parasito (Schenkman, Eichinger et al. 1994). A interação das trans-sialidases com a célula desempenha importante papel na adesão e invasão (Schenkman, Vandekerckhove et al. 1993), sendo que em células onde o ácido siálico está ausente a invasão é comprometida (Ming, Chuenkova et al. 1993, Lopez, Huynh et al. 2002). Uma vez que LAMP é abundante em lisossomos e rica em ácido siálico, nosso grupo se interessou pelo estudo dessas proteínas e seu papel na infecção celular pelo *T. cruzi*.

Em um trabalho desenvolvido por uma ex-aluna de mestrado do laboratório, foi demonstrado que a ausência dessas proteínas realmente altera a infecção celular pelo *T. cruzi* (Albertti, Macedo et al. 2010). Utilizando células deficientes para ambas as isoformas da proteína LAMP, fibroblastos KO-L1/2, foi demonstrado que essas proteínas são importantes no processo de invasão celular. As células KO-L1/2 apresentavam uma redução na taxa de invasão de quase três vezes quando comparadas às células selvagens (WT). Isso indicava que

essa redução na invasão estava intimamente ligada à relação do parasito com a presença de LAMP. Nesse trabalho, no entanto, não foi demonstrado o mecanismo pelo qual LAMP participa do processo de invasão. Resolvemos investigar aqui, se isso se devia ao ácido siálico presente nessas proteínas ou à propriedades intrínsecas de cada uma das isoformas da proteína LAMP. As duas glicoproteínas, apesar da semelhança estrutural e algumas funções em comum, são bem diferentes em sequência e a ausência de cada uma delas, isoladamente, promove alterações celulares distintas o que poderia levar a um papel diferencial dessas isoformas durante a infecção celular pelo *T. cruzi* (Cuervo e Dice 1996, Andrejewski, Punnonen et al. 1999, Nishino, Fu et al. 2000, Tanaka, Guhde et al. 2000, Eskelinen, Illert et al. 2002, Eskelinen, Tanaka et al. 2003). Foi demonstrado que embora a expressão da isoforma LAMP-1 na superfície celular leve a um aumento da interação e internalização do parasito na célula hospedeira (Kima, Burleigh et al. 2000), mutações em sua cauda citosólica são capazes de abolir esse efeito, indicando que características intrínsecas da cadeia polipeptídica dessas proteínas também poderiam participar do papel de LAMP durante a invasão do *T. cruzi* (Kima, Burleigh et al. 2000). Para investigar o papel de cada isoforma no processo de invasão celular, realizamos infecções de *T. cruzi* em fibroblastos deficientes para LAMP-2, KO-L2, e comparamos com a infecção em fibroblastos WT ou KO-L1/2. Nossos resultados mostraram que as células KO-L2 apresentam índice de invasão e percentual de infecção tão reduzidos quanto àquele observado para células KO-L1/2, indicando que a ausência da proteína LAMP-2 é suficiente para reduzir a invasão celular pelo *T. cruzi*. Uma vez que LAMP-1 é uma proteína altamente sialilada e está presente em células KO-L2, pode-se assumir que não só o ácido siálico dos glicoconjugados presentes nessas proteínas, mas também características intrínsecas da cadeia polipeptídica sejam responsáveis pelo fenótipo observado para as células KO-L2. Como mencionado, essas proteínas, embora com homologia estrutural, são distintas em sequência e função. Camundongos deficientes para

LAMP-2, ao contrário daqueles deficientes apenas para LAMP-1, apresentam-se inférteis e com problemas cardíacos (Tanaka, Guhde et al. 2000). Em nível celular, a deficiência de LAMP-2 leva ao acúmulo de vacúolos autofágicos em vários tipos celulares e acúmulo de colesterol nos compartimentos endocíticos, o que não acontece em células deficientes apenas para LAMP-1 (Eskelinen, Illert et al. 2002, Schneede, Schmidt et al. 2009). A presença desses vacúolos autofágicos não processados e acúmulo de colesterol nos compartimentos intracelulares é também observada em células KO-L1/2 (Andrejewski, Punnonen et al. 1999, Eskelinen, Schmidt et al. 2004, Schneede, Schmidt et al. 2009). É possível que essas alterações indiretamente interfiram com a entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira. Outra característica importante encontrada em células deficientes para LAMP é o fato de que a maturação de fagossomos nessas células é comprometida (Huynh, Eskelinen et al. 2007). A alteração observada nessa maturação parece ser devido ao comprometimento no recrutamento de RILP (Rab7-Interacting Lisosomal Protein), um efetor de Rab 7 responsável pelo recrutamento de proteínas motoras, envolvidas no transporte de vesículas em direção ao centro celular. O acúmulo de fagossomos não processados em células KO-L1/2 pode inclusive ser consequência da mobilidade alterada de lisossomos nessas células. Dessa forma, resolvemos investigar se outros processos envolvidos com mobilidade de lisossomos, poderiam estar comprometidos na ausência de LAMP-1/2 ou LAMP-2. Sabemos que a exocitose lisossomal depende da mobilidade dessa organela e é essencial para a entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira. Sendo assim, investigamos se a ausência de ambas as isoformas de LAMP ou apenas de LAMP-2 poderia comprometer a mobilização lisossomal em direção a periferia celular, fazendo com que um menor número de vesículas fossem recrutadas para o sítio de interação com o *T. cruzi*. No entanto, quando avaliamos a exocitose lisossomal, induzida por tratamento com Ionomicina, observamos que as células KO-L1/2 e KO-L2 apresentavam os mesmos níveis de exocitose obtidos para células WT. Dessa forma, a menor

invasão observada em células deficientes para LAMP-2 ou LAMP-1/2 não é consequência de uma menor capacidade de mobilização e exocitose de lisossomos por essas células. De fato, Gaspar e colaboradores (2009) também estudando a capacidade de exocitose lisossomal em células derivadas de camundongos deficientes para LAMP-1, LAMP-2 ou LAMP-1/2 não haviam observado nenhuma diminuição da capacidade exocítica dessas células em relação às células WT (Gaspar, Mortara et al. 2009). Na verdade, esses autores mostraram que células derivadas de camundongos deficientes para LAMP-2 ou LAMP-1/2 apresentavam capacidade exocítica aumentada em relação às células WT. A diferença entre os nossos dados e os obtidos por Gaspar e cols. (2009) pode ser devido ao fato de que as linhagens de fibroblastos usadas em nosso estudo são diferentes daquelas usadas por esse grupo. O processo de invasão poderia ainda estar comprometido por algum impedimento na endocitose compensatória gerada pela exocitose lisossomal, disparada pelo parasito, o qual também é parte crucial para o processo de invasão (Fernandes, Cortez et al. 2011). Esta hipótese será avaliada em estudos futuros.

Outro passo importante durante o processo de entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira e que influencia a taxa de invasão celular é a capacidade de adesão dos parasitos à célula. Ming e colaboradores (1993) haviam demonstrado que mutantes de células CHO (Chinese Hamster Ovary cells), deficientes em ácido siálico, apresentavam taxa de adesão e invasão celular reduzidas (Ming, Chuenkova et al. 1993). Embora, em células KO-L2 ainda tivéssemos a presença de LAMP-1, que também é altamente sialilada, a redução de ácido siálico pela ausência de LAMP-2 nessas células poderia também estar contribuindo para uma menor taxa de adesão e conseqüentemente de invasão celular. O ensaio revelou que a taxa de adesão dos tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* é menor em células KO-L2 e KO-L1/2 do que em células WT, não havendo diferença significativa entre as células KO-L2 e KO-L1/2. Esses resultados corroboram com os dados da literatura, mostrando que quanto menor a taxa



de adesão, menor o índice de invasão celular pelo parasito. Como não houve diferença nas taxas de adesão observadas para células KO-L2 e KO-L1/2, é pouco provável que apenas a diminuição do ácido siálico, referente à ausência de LAMP-2 em células KO-L2, seja responsável pelo fenótipo observado. Adicionalmente, esses dados sugerem mais uma vez que LAMP-2 tem papel crucial e seria o principal responsável pelo fenótipo de adesão observado em células KO-L1/2. Baseado nesses dados, características intrínsecas da cadeia polipeptídica de LAMP-2 são tão ou mais importantes que a presença do ácido siálico ligado aos seus glicoconjugados. De fato, Rubin-de-Celis e colaboradores (2006) mostraram que parasitos que apresentam baixa ou alta atividade de trans-sialidase são igualmente capazes de invadir as células. Isso sugere que apenas uma pequena quantidade de ácido siálico seria suficiente para o processo de invasão. Nesse caso, o ácido siálico presente em outras proteínas da membrana plasmática da célula ou mesmo de outras proteínas lisossomais, menos abundantes, já poderiam ser suficientes para o processo de adesão e invasão mediado pelas trans-sialidasas. Quando analisamos o vacúolo parasitóforo formado em células KO-L2 ou KO-L1/2 observamos que as membranas desses vacúolos apresentaram-se intimamente justapostas à membrana do parasito, exatamente como aqueles formados em células WT. Lopez e colaboradores (2002) demonstraram que a ausência do ácido siálico em células CHO mutantes promove a formação de um vacúolo parasitóforo mais largo, enquanto que nas células CHO selvagens a membrana do vacúolo é extremamente justaposta à membrana do *T. cruzi* (Lopez, Huynh et al. 2002). Assim, o fato das células KO-L2 e KO-L1/2 possuírem outras glicoproteínas sialiladas seria suficiente para a formação de um vacúolo justaposto, e que o ácido siálico presente em LAMP-1 e LAMP-2 não interfere nesta justaposição.

Se a cadeia polipeptídica LAMP-2 diretamente influencia no processo de adesão do parasito ou se a ausência de LAMP-2 interfere com outros componentes que medeiam esse processo de adesão, não se sabe. Como mencionado anteriormente, Kima e colaboradores

(2000) mostraram que células que superexpressam LAMP-1 na superfície apresentam aumento na taxa de invasão pelo *T. cruzi*. No entanto, quando a cauda citoplasmática dessa proteína é mutada esse aumento da invasão é abolido. Visto que essa mutação manteve preservada a porção luminal de LAMP-1, os dados mostram que não só o domínio luminal sialilado dessa proteína é importante para os processos de interação e internalização do parasito, mas também características inerentes de LAMP-1. Portanto, a porção intramembranar e/ou cauda citosólica de LAMP-2 pode também ser responsável pelos fenótipos observados. No caso de LAMP-1, sabe-se que a expressão na membrana plasmática da forma que contém a mutação compromete a capacidade endocítica da célula, o que justificaria o fenótipo observado no trabalho de Kima e colaboradores (Kima, Burleigh et al. 2000). No caso de LAMP-2 é possível que porções intrínsecas dessa proteína possam ser responsáveis por ativação de vias intracelulares que culminam com a internalização do parasito. Sabe-se que LAMP-2 é responsável pela captação de proteínas citosólicas a serem degradadas por lisossomos durante processos autofágicos. Sua ausência interfere com essa via e pode alterar processos celulares dependentes dela. De fato, muitos tipos celulares provenientes de camundongos KO-L2 ou KO-L1/2 apresentam um número maior de vacúolos autofágicos devido à diminuição na reciclagem deste compartimento pela célula, mostrando que há um comprometimento dessa via. Recentemente, alguns trabalhos ligaram processos autofágicos com a entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira, mostrando que a indução de autofagia através de estresse nutricional ou por indução de vias ligadas a autofagia aumentaram a infecção celular pelo parasito. Talvez diferenças na reciclagem de proteínas nessas células possa comprometer eventos envolvidos com a invasão celular pelo *T. cruzi*.

Além da invasão celular, nosso grupo já havia mostrado que a taxa de multiplicação intracelular do *T. cruzi* em células KO-L1/2 também era alterada quando comparada com células WT (Albertti, Macedo et al. 2010). Nas células onde ambas as proteínas LAMP estão

ausentes a multiplicação do parasito ocorre de modo mais acelerado do que nas WT. Além de encontrarmos maior número de amastigotas no interior destas células a quantidade de tripomastigotas liberado também é acentuadamente maior (Albertti, Macedo et al. 2010). Para verificar o papel de LAMP-2 e indiretamente LAMP-1 nesse processo, acompanhamos a evolução da infecção nos diferentes tipos celulares 24, 48 e 72 horas após a exposição aos parasitos. Observamos que 72 horas após a invasão, células KO-L2, assim como células KO-L1/2 apresentaram um aumento na quantidade de parasitos intracelulares em comparação com células WT. Sabemos que para se transformar na forma amastigota replicativa o parasito precisa escapar do vacúolo parasitóforo e se alojar no citoplasma. Para isso o *T. cruzi* utiliza a Tc-TOX, uma enzima putativa ativa em pH ácido, que forma poros na membrana do vacúolo parasitóforo, permitindo seu escape para o citosol celular (Andrews 1990, Andrews, Abrams et al. 1990). É sabido que a membrana do vacúolo parasitóforo fica mais sensível à ação da Tc-TOX na ausência do ácido siálico, permitindo que o parasito escape mais rapidamente de seu do vacúolo (Hall, Webster et al. 1992, Schenkman, Vandekerckhove et al. 1993). Isso se deve, provavelmente, por que a inserção de Tc-TOX na membrana do vacúolo parasitóforo ocorre com maior facilidade na ausência de ácido siálico. Nesse caso, a quantidade de ácido siálico presente no vacúolo pode ser importante, uma vez que a taxa de atividade de trans-sialidase pode interferir na velocidade de escape do parasito de seu vacúolo parasitóforo (Rubin-de-Celis, Uemura et al. 2006). Rubin-de-Celis e colaboradores (2006) mostraram que parasitos superexpressores de trans-sialidases ativas induzem um escape mais rápido do vacúolo parasitóforo para o citosol celular. Um escape mais rápido do vacúolo poderia então levar a uma multiplicação mais rápida do *T. cruzi*. Dessa forma, decidimos verificar se a alta taxa de multiplicação dos parasitos observada para células KO-L2 e KO-L1/2 poderia ser justificada por uma diminuição de ácido siálico suficiente para um escape mais rápido destes parasitos do vacúolo para o citosol da célula. Para isso, fizemos uma cinética de maturação do

vacúolo até seu rompimento e escape do *T. cruzi* para o citosol celular. Como mencionado anteriormente, a internalização do parasito se dá inicialmente por um vacúolo formado por membrana plasmática e lisossomal durante o processo de endocitose compensatória, induzido pela exocitose de lisossomos (Fernandes, Cortez et al. 2011). Gradativamente mais lisossomos vão se fundindo até que o vacúolo esteja recoberto por marcadores lisossomais e este processo é imperativo para a viabilidade da infecção, uma vez que sem a fusão lisossomal, os parasitos são capazes de escapar da célula hospedeira (Andrade e Andrews 2004). Após esse passo, o vacúolo maduro é rompido e os parasitos ficam livres no citoplasma. Observamos que, logo após a exposição aos parasitos, as células KO-L2 recrutaram lisossomos mais rapidamente para o vacúolo recém formado do que as células WT. Uma hora após a exposição aos parasitos, como esperado, todos os tripomastigotas internalizados encontravam-se dentro de vacúolos revestidos por membrana lisossomal. No entanto, nas horas subsequentes, 4 e 8 horas após a invasão, embora não tenhamos observado uma diferença significativa entre células WT e KO-L2, observamos já um declínio na co-localização de parasitos com lisossomos nas células KO-L2 que não foi visto para as células WT. Doze horas após a invasão, quase todos os parasitos intracelulares já escaparam do vacúolo parasitóforo em ambos os tipos celulares. É possível que essa tendência de escape mais cedo, observada nas células KO-L2 seja realmente responsável pela multiplicação mais rápida do parasito. Infelizmente, por usarmos anticorpos dirigidos para a própria proteína LAMP na identificação dos lisossomos, não pudemos realizar os mesmos experimentos nas células KO-L1/2. No entanto, é importante ressaltar que dados anteriores do laboratório (não publicados) mostraram que em células KO-L1/2 as formas tripomastigotas se transformam mais cedo nas formas amastigotas replicativas. Nessas células, 8 horas após a invasão, aproximadamente 30% dos parasitos intracelulares foram reconhecidos por anticorpos específicos para a forma amastigota, enquanto apenas 20% dos parasitos intracelulares em

células WT apresentaram-se marcados por esse mesmo anticorpo (Albertti 2009). É possível que o mesmo esteja ocorrendo nas células KO-L2. Ainda temos que realizar a marcação com o anticorpo específico para a forma amastigota, com o intuito de averiguar essa possibilidade. Adicionalmente, a alteração do perfil de expressão de outras proteínas do parasito, talvez relacionadas ao ciclo celular, em células deficientes para a proteína LAMP-2, possa ser responsável pela maior multiplicação do parasito nessas células. Ainda, diferenças na indução de estresse oxidativo em células WT, KO-L2 ou KO-L1/2 podem estar contribuindo para o perfil de multiplicação intracelular observado. Esses ensaios serão ainda realizados.

Uma vez que a maior taxa de multiplicação intracelular, observada nas células KO-L2 e KO-L1/2, poderia estar ligada a alterações no perfil de expressão dos parasitos, decidimos investigar se formas tripomastigotas liberadas pelos diferentes tipos celulares apresentaria algum comportamento diferencial em novas infecções celulares. Para isso, realizamos infecções de fibroblastos WT com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, produzidas por células WT, KO-L2 ou KO-L1/2. Pudemos observar que parasitos provenientes das células KO-L2 e WT apresentaram a mesma taxa de invasão, indicando que a passagem por células deficientes em LAMP-2 não é capaz de alterar a capacidade invasiva desses parasitos. No entanto, a infecção de fibroblastos WT foi menor quando utilizadas as formas tripomastigotas derivadas de células KO-L1/2. Esses dados mostram que a passagem por células deficientes em LAMP-1 e 2, de alguma forma altera a superfície do parasito, diminuindo sua capacidade invasiva. É possível que a ausência das duas isoformas de LAMP e consequentemente uma menor quantidade de ácido siálico no vacúolo alterem as proteínas de superfície modificando sua capacidade de adesão ou sua capacidade de sinalização na célula hospedeira. Como nos ensaios de invasão dos tripomastigotas provenientes das células LLC-MK2 a invasão diminuída foi consequência de uma menor adesão desses parasitos, realizamos ensaios de adesão nas células WT com os tripomastigotas provenientes dos diferentes fibroblastos em

estudo. Contudo não observamos diferenças entre os grupos. Sendo assim, a menor infectividade de parasitos obtidos de células KO-L1/2 não se deve a uma adesão diminuída. Dessa forma, parasitos originados de células deficientes em LAMP-1 e 2 podem apresentar menor competência na ativação de vias de sinalização que culminam com sua internalização pela célula hospedeira.

É possível que parasitos provenientes de células onde LAMP-1 e 2 estejam ausentes, possam ser menos competentes na indução de sinais de cálcio o que levaria a um menor recrutamento de lisossomos e finalmente a uma menor capacidade infectiva. Essas hipóteses precisam ser ainda investigadas. Vale ressaltar que, embora tenhamos encontrado diferenças na capacidade infectiva desses parasitos, a taxa de multiplicação intracelular não foi modificada.



## 7. CONCLUSÕES

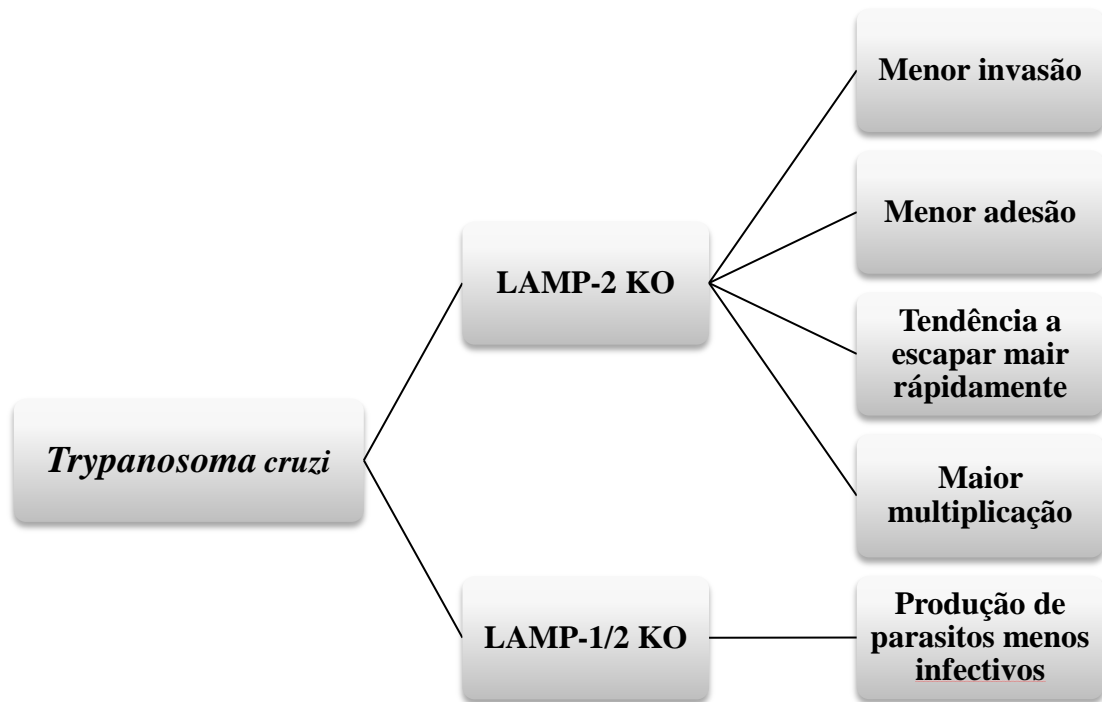


Figura 15 - Diagrama relacionando os eventos observados nas células deficientes para LAMP-2 e para LAMP-1/2 em comparação com as células WT, nos processos experimentais de infecção celular pelo *T. cruzi*.

Devido à morfologia do vacúolo parasitóforo não ser alterada na presença ou ausência de LAMP-2 acreditamos que, características intrínsecas da proteína sejam primordiais para o fenótipo de invasão observada em células KO-L2 e KO-L1/2, e, ainda, que a alteração no perfil de multiplicação intracelular em células deficientes para LAMP-2 ou LAMP-1/2 pode ser em virtude da alteração do tráfego intracelular do parasito, pois os parasitos que infectaram as células deficientes para LAMP-2 apresentaram uma tendência ao escape mais rápido do vacúolo parasitóforo, o que poderia beneficiá-lo na multiplicação.

Assim, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que realmente há um papel diferencial das proteínas LAMP-1 e 2 nos processos de invasão e colonização celular pelo parasito, indicando que mais do que seus gliconjugados modificados com ácido siálico, características intrínsecas da proteína são importantes na modulação desses eventos.



Adicionalmente, os resultados sugerem que LAMP-2 seja o principal responsável pelas características observadas para células KO-L1/2.

---

**REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- Acosta, A., R. P. Schenkman and S. Schenkman (1994). "Sialic acid acceptors of different stages of *Trypanosoma cruzi* are mucin-like glycoproteins linked to the parasite membrane by GPI anchors." *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27(2): 439-442.
- Acosta, A. M. and C. A. Santos-Buch (1985). "Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*." *Circulation* 71(6): 1255-1261.
- Albajar-Vinas, P. and J. Jannin (2011). "The hidden Chagas disease burden in Europe." *Euro Surveill* 16(38).
- Albertti, L. A., A. M. Macedo, E. Chiari, N. W. Andrews and L. O. Andrade (2010). "Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development." *Microbes Infect* 12(10): 784-789.
- Albertti, L. A. G. (2009). Estudo da importância de LAMP(Lysosomal Associated Membrane Protein) na invasão e multiplicação do *Trypanosoma cruzi* na célula hospedeira. Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Amato Neto, V. and J. Pasternak (2009). "[Chagas disease centenary]." *Rev Saude Publica* 43(2): 381-382.
- Andrade, L. O. and N. W. Andrews (2004). "Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells." *J Exp Med* 200(9): 1135-1143.
- Andrade, L. O. and N. W. Andrews (2005). "The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention." *Nat Rev Microbiol* 3(10): 819-823.
- Andrade, L. O., L. M. Galvao, N. Meirelles Mde, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (2010). "Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(6): 834-837.
- Andrade, L. O., C. R. Machado, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (1999). "Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice." *Mol Biochem Parasitol* 100(2): 163-172.
- Andrade, L. O., C. R. Machado, E. Chiari, S. D. Pena and A. M. Macedo (2002). "*Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations." *Exp Parasitol* 100(4): 269-275.
- Andrade, Z. A. (1982). "[Pathogenesis of Chagas' disease. New aspects]." *Arq Bras Cardiol* 38(4): 255-260.
- Andrejewski, N., E. L. Punnonen, G. Guhde, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, K. von Figura and P. Saftig (1999). "Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice." *J Biol Chem* 274(18): 12692-12701.

- Andrews, N. W. (1990). "The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. [Review]." *Exp. Parasitol.* 71(2): 241-244.
- Andrews, N. W., C. K. Abrams, S. L. Slatin and G. Griffiths (1990). "A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH." *Cell* 61(7): 1277-1287.
- Anez, N., H. Carrasco, H. Parada, G. Crisante, A. Rojas, C. Fuenmayor, N. Gonzalez, G. Percoco, R. Borges, P. Guevara and J. L. Ramirez (1999). "Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients." *Am J Trop Med Hyg* 60(5): 726-732.
- Bern, C., D. L. Martin and R. H. Gilman (2011). "Acute and congenital Chagas disease." *Adv Parasitol* 75: 19-47.
- Burleigh, B. and N. W. Andrews (1995). "A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca<sup>2+</sup> signaling factor for mammalian cells." *J. Biol. Chem.* 270: 5172-5180.
- Burleigh, B. A. and N. W. Andrews (1998). "Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." *Curr Opin Microbiol* 1(4): 461-465.
- Burleigh, B. A., E. V. Caler, P. Webster and N. W. Andrews (1997). "A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells." *J. Cell Biol.* 136: 609-620.
- Caler, E. V., S. Vaena de Avalos, P. A. Haynes, N. W. Andrews and B. A. Burleigh (1998). "Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." *EMBO J.* 17: 4975-4986.
- Campos, J. V. and W. L. Tafuri (1973). "Chagas enteropathy." *Gut* 14(11): 910-919.
- Ceballos, L. A., R. V. Piccinali, P. L. Marcet, G. M. Vazquez-Prokopec, M. V. Cardinal, J. Schachter-Broide, J. P. Dujardin, E. M. Dotson, U. Kitron and R. E. Gurtler (2011). "Hidden sylvatic foci of the main vector of Chagas disease *Triatoma infestans*: threats to the vector elimination campaign?" *PLoS Negl Trop Dis* 5(10): e1365.
- Chagas, C. (1909). "Nova Trypanozomíaze Humana." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1: 11-80.
- Chen, J. W., G. L. Chen, M. P. D'Souza, T. L. Murphy and J. T. August (1986). "Lysosomal membrane glycoproteins: properties of LAMP-1 and LAMP-2." *Biochem Soc Symp* 51: 97-112.
- Chuenkova, M. V. and M. Pereiraperrin (2006). "Enhancement of tyrosine hydroxylase expression and activity by *Trypanosoma cruzi* parasite-derived neurotrophic factor." *Brain Res* 1099(1): 167-175.

- Ciavaglia, M., T. U. De Carvalho and W. de Souza (1993). "Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 718-721.
- Corral, R. S., N. A. Guerrero, H. Cuervo, N. Girones and M. Fresno (2013). "Trypanosoma cruzi infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes." *PLoS Negl Trop Dis* 7(2): e2034.
- Cossio, P. M., M. B. Casanova, C. Bellido, L. Arce, R. Storino, M. T. de la Vega, C. Diez and R. M. Arana (1985). "Autoimmune response against myocardial tissue in Chagas' disease." *Medicina (B Aires)* 45(6): 643-648.
- Coura, J. R. (2013). "The discovery of chagas disease (1908-1909): great successes and certain misunderstandings and challenges." *Rev Soc Bras Med Trop* 46(4): 389-390.
- Coura, J. R., N. Anunziato and H. P. Willcox (1983). "[Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro]." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78(3): 363-372.
- Coura, J. R. and J. Borges-Pereira (2011). "Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(6): 641-645.
- Coura, J. R. and J. C. Dias (2009). "Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 31-40.
- Coura, J. R. and P. A. Vinas (2010). "Chagas disease: a new worldwide challenge." *Nature* 465(7301): S6-7.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (1996). "A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes." *Science* 273: 501-503.
- de Melo-Jorge, M. and M. PereiraPerrin (2007). "The Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi* exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts." *Cell Host Microbe* 1(4): 251-261.
- Del Nery, E., M. A. Juliano, A. P. Lima, J. Scharfstein and L. Juliano (1997). "Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*." *J Biol Chem* 272(41): 25713-25718.
- Dorta, M. L., A. T. Ferreira, M. E. Oshiro and N. Yoshida (1995). "Ca<sup>2+</sup> signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion." *Mol Biochem Parasitol* 73(1-2): 285-289.
- Dutra, W. O. and K. J. Gollob (2008). "Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease." *Curr Opin Infect Dis* 21(3): 287-292.
- Dutra, W. O., C. A. Menezes, F. N. Villani, G. C. da Costa, A. B. da Silveira, D. Reis and K. J. Gollob (2009). "Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective

and pathogenic immune responses in human Chagas disease." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 208-218.

Epting, C. L., B. M. Coates and D. M. Engman "Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." *Exp Parasitol* 126(3): 283-291.

Eskelinen, E. L., A. L. Illert, Y. Tanaka, G. Schwarzmann, J. Blanz, K. Von Figura and P. Saftig (2002). "Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy." *Mol Biol Cell* 13(9): 3355-3368.

Eskelinen, E. L., C. K. Schmidt, S. Neu, M. Willenborg, G. Fuertes, N. Salvador, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, J. Heeren, K. von Figura, E. Knecht and P. Saftig (2004). "Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts." *Mol Biol Cell* 15(7): 3132-3145.

Eskelinen, E. L., Y. Tanaka and P. Saftig (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." *Trends Cell Biol* 13(3): 137-145.

Favoreto, S., Jr., M. L. Dorta and N. Yoshida (1998). "*Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion." *Exp Parasitol* 89(2): 188-194.

Fernandes, M. C. and N. W. Andrews (2012). "Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence." *FEMS Microbiol Rev* 36(3): 734-747.

Fernandes, M. C., M. Cortez, A. R. Flannery, C. Tam, R. A. Mortara and N. W. Andrews (2011). "*Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion." *J Exp Med* 208(5): 909-921.

Ferreira, A. V., M. Segatto, Z. Menezes, A. M. Macedo, C. Gelape, L. de Oliveira Andrade, F. Nagajyothi, P. E. Scherer, M. M. Teixeira and H. B. Tanowitz (2011). "Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease." *Microbes Infect* 13(12-13): 1002-1005.

Franco, D. J., A. R. Vago, E. Chiari, F. C. Meira, L. M. Galvao and C. R. Machado (2003). "*Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat." *Exp Parasitol* 104(1-2): 54-61.

Franco-Paredes, C., A. Von, A. Hidron, A. J. Rodriguez-Morales, I. Tellez, M. Barragan, D. Jones, C. G. Naquira and J. Mendez (2007). "Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America." *BMC Int Health Hum Rights* 7: 7.

Fukuda, M. (1991). "Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking." *J Biol Chem* 266(32): 21327-21330.

Fukuda, M. (1988). "Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences." *J. Biol. Chem.* 1988 263: 18920-8.

- Gaspar, E. B., R. A. Mortara, L. O. Andrade and C. V. da Silva (2009). "Lysosomal exocytosis: an important event during invasion of lamp deficient cells by extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi*." *Biochem Biophys Res Commun* 384(2): 265-269.
- Granger, B., S. A. Green, C. A. Gabel, C. L. Howe, I. Mellman and A. Helenius (1990). "Characterization and cloning of lgp 110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells." *J. Biol. Chem.* 265: 12036-12043.
- Gurtler, R. E., U. Kitron, M. C. Cecere, E. L. Segura and J. E. Cohen (2007). "Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(41): 16194-16199.
- Hall, B. F., P. Webster, A. K. Ma, K. A. Joiner and N. W. Andrews (1992). "Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm." *J. Exp. Med.* 176: 313-325.
- Hissa, B., J. G. Duarte, L. F. Kelles, F. P. Santos, H. L. del Puerto, P. H. Gazzinelli-Guimaraes, A. M. de Paula, U. Agero, O. N. Mesquita, C. Guatimosim, E. Chiari and L. O. Andrade (2012). "Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells." *PLoS Negl Trop Dis* 6(3): e1583.
- Hull, R. N., W. R. Cherry and O. J. Tritch (1962). "Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK1, LLC-MK2, and LLC-MK2(NCTC-3196) and their utility in virus research." *J Exp Med* 115: 903-918.
- Huynh, K. K., E. L. Eskelinen, C. C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig and S. Grinstein (2007). "LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes." *EMBO J* 26(2): 313-324.
- Kierszenbaum, F., E. Knecht, D. B. Budzko and M. C. Pizzimenti (1974). "Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*." *J Immunol* 112(5): 1839-1844.
- Kima, P., B. Burleigh and N. W. Andrews (2000). "Surface-targeted lysosomal glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." *Cellular Microbiology* 2(6): 477-486.
- Lages-Silva, E., E. Crema, L. E. Ramirez, A. M. Macedo, S. D. Pena and E. Chiari (2001). "Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism." *Am J Trop Med Hyg* 65(5): 435-441.
- Leite, M. F., M. S. Moyer and N. W. Andrews (1998). "Expression of the mammalian calcium signaling response to *Trypanosoma cruzi* in *Xenopus laevis* oocytes." *Mol Biochem Parasitol* 92(1): 1-13.
- Lewis, V., S. A. Green, M. Marsh, P. Vihko, A. Helenius and I. Mellman (1985). "Glycoproteins of the lysosomal membrane." *J Cell Biol* 100(6): 1839-1847.

- Ley, V., E. S. Robbins, V. Nussenzweig and N. W. Andrews (1990). "The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments." *J. Exp. Med.* 171: 401-413.
- Lopez, M., C. Huynh, L. O. Andrade, M. Pypaert and N. W. Andrews (2002). "Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion." *Mol Biochem Parasitol* 119(1): 141-145.
- Luzio, J. P., P. R. Pryor and N. A. Bright (2007). "Lysosomes: fusion and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8): 622-632.
- Marks, M. S., H. F. Heijnen and G. Raposo (2013). "Lysosome-related organelles: unusual compartments become mainstream." *Curr Opin Cell Biol* 25(4): 495-505.
- Matsuda, N. M., S. M. Miller and P. R. Evora (2009). "The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease." *Clinics (Sao Paulo)* 64(12): 1219-1224.
- Ming, M., M. Chuenkova, E. Ortega-Barria and M. E. Pereira (1993). "Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome." *Mol Biochem Parasitol* 59(2): 243-252.
- Molina, H. A., J. Milei and R. Storino (1984). "Chronic Chagas' myocardopathy. Demonstration of in vivo bound immunoglobulins in heart structures by the immunoperoxidase technique." *Cardiology* 71(6): 297-306.
- Mullins, C. and J. S. Bonifacino (2001). "The molecular machinery for lysosome biogenesis." *Bioessays* 23(4): 333-343.
- Munoz-Fernandez, M. A., M. A. Fernandez and M. Fresno (1992). "Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism." *Immunol Lett* 33(1): 35-40.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. J. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro and M. Hirano (2000). "Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)." *Nature* 406(6798): 906-910.
- Nunes, M. C., W. Dones, C. A. Morillo, J. J. Encina, A. L. Ribeiro and C. Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of (2013). "Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects." *J Am Coll Cardiol* 62(9): 767-776.
- Prata, A. (2001). "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease." *Lancet Infect Dis* 1(2): 92-100.
- Previato, J. O., A. F. Andrade, M. C. Pessolani and L. Mendonca-Previato (1985). "Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route." *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 85-96.



- Ramirez, M. I., C. Ruiz Rde, J. E. Araya, J. F. Da Silveira and N. Yoshida (1993). "Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion." *Infect Immun* 61(9): 3636-3641.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi, W. C. Little, S. S. Xavier, S. G. Rassi, A. G. Rassi, G. G. Rassi, A. Hasslocher-Moreno, A. S. Sousa and M. I. Scanavacca (2006). "Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease." *N Engl J Med* 355(8): 799-808.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." *Lancet* 375(9723): 1388-1402.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi and S. G. Rassi (2007). "Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies." *Circulation* 115(9): 1101-1108.
- Reddy, A., E. Caler and N. Andrews (2001). "Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes." *Cell* 106: 157-169.
- Rodriguez, A., I. Martinez, A. Chung, C. H. Berlot and N. W. Andrews (1999). "cAMP regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes." *J Biol Chem* 274(24): 16754-16759.
- Rodriguez, A., P. Webster, J. Ortego and N. W. Andrews (1997). "Lysosomes behave as Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells." *J. Cell Biol.* 137: 93-104.
- Rubin-de-Celis, S. S., H. Uemura, N. Yoshida and S. Schenkman (2006). "Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole." *Cell Microbiol* 8(12): 1888-1898.
- Ruiz, R., V. L. Rigoni, J. Gonzalez and N. Yoshida (1993). "The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion." *Parasit. Immunol.* 15(2): 121-125.
- Ruiz, R. C., S. Favoreto, Jr., M. L. Dorta, M. E. Oshiro, A. T. Ferreira, P. M. Manque and N. Yoshida (1998). "Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity." *Biochem J* 330 ( Pt 1): 505-511.
- Scharfstein, J., V. Schmitz, V. Morandi, M. M. Capella, A. P. Lima, A. Morrot, L. Juliano and W. Muller-Esterl (2000). "Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors." *J Exp Med* 192(9): 1289-1300.
- Schenkman, R. P., F. Vandekerckhove and S. Schenkman (1993). "Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*." *Infect Immun* 61(3): 898-902.
- Schenkman, S., C. Diaz and V. Nussenzweig (1991). "Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains." *Exp. Parasitol.* 72(1): 76-86.
- Schenkman, S., D. Eichinger, M. E. Pereira and V. Nussenzweig (1994). "Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase." *Annu Rev Microbiol* 48: 499-523.

Schenkman, S., M. S. Jiang, G. W. Hart and V. Nussenzweig (1991). "A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells." *Cell* 65: 1117-1125.

Schenkman, S., T. Kurosaki, J. V. Ravetch and V. Nussenweig (1992). "Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of non-phagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*." *J. Exp. Med.* 175: 1635-1641.

Schenkman, S., Pontes, de, Carvalho, L and V. Nussenzweig (1992). "Trypanosoma cruzi trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes." *J. Exp. Med.* 175(2): 567-575.

Schneede, A., C. K. Schmidt, M. Holtta-Vuori, J. Heeren, M. Willenborg, J. Blanz, M. Domansky, B. Breiden, S. Brodesser, J. Landgrebe, K. Sandhoff, E. Ikonen, P. Saftig and E. L. Eskelinen (2009). "Role for LAMP-2 in endosomal cholesterol transport." *J Cell Mol Med.*

Schofield, C. J. and J. C. Dias (1999). "The Southern Cone Initiative against Chagas disease." *Adv Parasitol* 42: 1-27.

Silveira, A. C. and J. C. Dias (2011). "[The control of vectorial transmission]." *Rev Soc Bras Med Trop* 44 Suppl 2: 52-63.

Tam, C., V. Idone, C. Devlin, M. C. Fernandes, A. Flannery, X. He, E. Schuchman, I. Tabas and N. W. Andrews (2010). "Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair." *J Cell Biol* 189(6): 1027-1038.

Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura and P. Saftig (2000). "Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice." *Nature* 406(6798): 902-906.

Tanowitz, H., M. Wittner, Y. Kress and B. Bloom (1975). "Studies of in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells." *Am J. Trop. Med. Hyg.* 24: 25-36.

Tanowitz, H. B. (1992). "Chagas Disease." *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 400-419.

Tardieux, I., M. H. Nathanson and N. W. Andrews (1994). "Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> transients." *J Exp Med* 179(3): 1017-1022.

Tardieux, I., P. Webster, J. Ravesloot, W. Boron, J. A. Lunn, J. E. Heuser and N. W. Andrews (1992). "Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells." *Cell* 71: 1117-1130.

Vago, A. R., L. O. Andrade, A. A. Leite, D. d'Avila Reis, A. M. Macedo, S. J. Adad, S. Tostes, Jr., M. C. Moreira, G. B. Filho and S. D. Pena (2000). "Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs." *Am J Pathol* 156(5): 1805-1809.

- Vago, A. R., A. M. Macedo, S. J. Adad, D. D. Reis and R. Correa-Oliveira (1996). "PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease." *Lancet* 348(9031): 891-892.
- Viotti, R., C. Vigliano, H. Armenti and E. Segura (1994). "Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up." *Am Heart J* 127(1): 151-162.
- Yoshida, K. and V. T. Nachmias (1989). "Calcium sequestration in human platelets: is it stimulated by protein kinase C?. [Review]." *Cell Calcium* 10(5): 299-307.
- Yoshida, N. (2006). "Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." *An Acad Bras Cienc* 78(1): 87-111.
- Yoshida, N. (2009). "Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 101-107.
- Yoshida, N. and M. Cortez (2008). "*Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process." *Subcell Biochem* 47: 82-91.
- Yoshida, N., M. L. Dorta, A. T. Ferreira, M. E. Oshiro, R. A. Mortara, A. Acosta-Serrano and S. Favoreto Junior (1997). "Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction." *Mol Biochem Parasitol* 84(1): 57-67.
- Yoshida, N., R. A. Mortara, M. F. Araguth, J. C. Gonzalez and M. Russo (1989). "Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*." *Infect Immun* 57(6): 1663-1667.