

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

MARLUS ALVES DOS SANTOS

ESTUDOS DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO MOBILIZADAS PELA CEPA G  
DE *Trypanosoma cruzi* NA INVASÃO CELULAR, DA SINALIZAÇÃO  
INTRACELULAR ATIVADA PELA PROTEÍNA P21-HIS<sub>6</sub> E SEU  
RENOVELAMENTO

UBERLÂNDIA-MG

ABRIL 2013

MARLUS ALVES DOS SANTOS

ESTUDOS DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO MOBILIZADAS PELA CEPA G  
DE *Trypanosoma cruzi* NA INVASÃO CELULAR, DA SINALIZAÇÃO  
INTRACELULAR ATIVADA PELA PROTEÍNA P21-HIS<sub>6</sub> E SEU  
RENOVELAMENTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

UBERLÂNDIA-MG

ABRIL 2013

ESPAÇO PARA A FOLHA DE APROVAÇÃO

*À minha mãe e à minha esposa, que estiveram sempre ao meu lado nos momentos felizes e nos momentos difíceis, sempre me apoiando e me incentivando a prosseguir nesta jornada em busca do conhecimento científico.*

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, meu estimado orientador, por ter aceitado o desafio de instruir e orientar um Enfermeiro sem experiência alguma em pesquisa a trilhar os caminhos da Ciência em direção à conquista do título de mestre.
- Agradeço à minha amiga, a Doutoranda Adele Aud Rodrigues, brilhante pesquisadora que me ensinou as primeiras noções e práticas de laboratório.
- Agradeço aos meus amigos do LATRI pelo companheirismo, apoio e colaboração em todos os momentos em que precisei de ajuda.
- Agradeço aos membros da banca por sua disponibilidade em prestigiar minha defesa e suas valiosas contribuições.
- Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo e à Doutoranda Heline Hellen, nossos colaboradores e parceiros que me ensinaram muito durante o tempo que estagiei no Instituto de Física da USP de São Carlos.
- Agradeço ao Prof. Dr. Renato Arruda Mortara e ao Prof. Dr. Fernando Real pelo acolhimento, parceria e colaboração durante o tempo em que estive no Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia da UNIFESP para executar uma etapa fundamental deste trabalho.
- Agradeço à equipe do Laboratório de Experimentação Animal (LEA – UFU) por toda ajuda e compreensão durante as etapas em que precisamos usar as instalações do Biotério.
- Agradeço à Técnica Mariane da Histologia, brilhante profissional e hábil operadora do Microscópio Confocal por sua dedicação e boa vontade na captura das belas imagens que utilizamos neste trabalho.
- Agradeço às Técnicas Dona Zilda e Edilge pela sua dedicação ao LATRI.
- Agradeço aos órgãos de apoio financeiro: FAPEMIG, FAPESP, CNPq e Capes por toda ajuda de custo que obtivemos durante estes dois anos de mestrado.
- Por fim, agradeço à Universidade Federal de Uberlândia por todo conhecimento e experiência que adquiri.

*“Somos apenas uma raça avançada de macacos em um planeta menor do que uma estrela média. Mas podemos entender o Universo. Isso nos torna algo muito especial.”*

Stephen Hawking

## RESUMO

*Trypanosoma cruzi* é o causador da Doença de Chagas, a qual induz alterações patológicas severas no coração, esôfago e cólon, afetando milhões de pessoas na América Latina. Recentemente nosso grupo caracterizou uma proteína recombinante de 21 kDa (P21-His<sub>6</sub>) baseada na forma nativa secretada por *T. cruzi*. Essa proteína aumentou a internalização de parasitas na célula hospedeira e estimulou o processo fagocítico de partículas de zymosan por macrófagos peritoneais. A proteína recombinante é purificada a partir dos corpos de inclusão e também a partir da fração solúvel do extrato bacteriano. As proteínas obtidas a partir de cada fração foram comparadas para verificar se o processo de renovelamento produzia uma proteína com a mesma estrutura secundária da proteína solúvel. Confirmou-se que independente do protocolo de purificação a estrutura secundária da proteína é a mesma, sendo que a proteína obtida a partir de cada fração é capaz de aumentar a internalização de parasitas e estimular o processo fagocítico de forma dependente da via de sinalização da PI3K. Os corpos de inclusão do extrato bacteriano fornece uma quantidade maior de proteína. Também investigamos as vias de sinalização envolvidas na invasão de macrófagos peritoneais, tratados com drogas inibidoras, por formas amastigotas extracelulares e tripomastigotas de cultura de tecido da cepa G de *T. cruzi* nas situações em que os parasitas estavam vivos, mortos ou opsonizados. Parasitas opsonizados são intensamente internalizados nos macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização. Amastigotas extracelulares (AE) vivos ativam as vias de PI3K e MAPKs e são internalizados em maior quantidade que AE mortos, que ativam apenas as vias das MAPKs. Tripomastigotas de cultura de tecidos vivos e mortos ativaram todas as vias de sinalização aqui estudadas.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, purificação, cromatografia, vias de sinalização.

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi* is the etiologic agent of Chagas' disease, which induces a pathological hypertrophy in the heart, esophagus and colon. This disease affects millions of peoples in Latin America. Recently our group characterized a 21 kDa *T. cruzi* recombinant protein (P21-His<sub>6</sub>) based on native form secreted by *T. cruzi*. P21-His<sub>6</sub> is purified from insoluble inclusion bodies or soluble fraction from bacterial extract. The protein obtained from each protocol has identical secondary structure and was capable of inducing parasite phagocytosis and increased zymosan particles internalization by macrophages cell being that process PI3 kinase signaling pathway dependent. In addition the refolding protocol generates of high amounts of the recombinant protein. Also we investigated the signaling pathway involved in amastigotes and trypomastigotes (living, dead and opsonized) *T. cruzi* developmental stages invasion using macrophages treated or not with signaling pathway inhibitors drugs. Opsonized parasites are internalized a lot. Living amastigotes triggered PI3K and MAPK signaling pathways, dead amastigotes activated only MAPKs pathway. Living and dead trypomastigotes activated all the signaling pathways studied.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, protein purification, chromatography, signaling pathway.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Tabela 1</b>	Inibidores das vias de sinalização	38
<b>Figura 1</b>	Esquema do protocolo de purificação e renovelamento da rnP21-His <sub>6</sub> .	46
<b>Figura 2</b>	Esquema do protocolo de purificação da sP21-His <sub>6</sub> .	46
<b>Figura 3</b>	Gel de poliacrilamida das frações solúvel e insolúvel da P21-His <sub>6</sub> .	47
<b>Figura 4</b>	Perfil cromatográfico da purificação da sP21-His <sub>6</sub> usando a coluna Superdex 75 10/300 GE Healthcare/Amersham Biosciences.	48
<b>Tabela 2</b>	Rendimento da P21-His <sub>6</sub> obtida por protocolo de purificação.	48
<b>Figura 5</b>	Espectropolarimetria de dicroísmo circular da sP21-His <sub>6</sub> .	49
<b>Figura 6:</b>	Comparação entre a rnP21-His <sub>6</sub> e a sP21-His <sub>6</sub> por espectropolarimetria de dicroísmo circular.	50
<b>Figura 7</b>	Ensaio de imunofluorescência da rnP21-His <sub>6</sub> e sP21-His <sub>6</sub> .	51
<b>Figura 8</b>	Dot Blot comparando a rnP21-His <sub>6</sub> e sP21-His <sub>6</sub> íntegras e desnaturadas pelo calor.	52
<b>Figura 9</b>	Western Blot em membrana de nitrocelulose evidenciando a rnP21-His <sub>6</sub> e sP21-His <sub>6</sub> s na forma íntegra e desnaturada.	53
<b>Figura 10</b>	Ensaio de invasão de células não-fagocíticas por AE de <i>T. cruzi</i> .	54
<b>Figura 11</b>	Ensaio de invasão de células não-fagocíticas por TCT de <i>T. cruzi</i> .	55
<b>Figura 12</b>	Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan.	56
<b>Figura 13</b>	Resultado do ensaio de fagocitose de partículas de zymosan.	56

<b>Figura 14</b>	Sinalização celular ativada pela P21-His <sub>6</sub> .	58
<b>Figura 15</b>	Ensaio de imunofluorescência com AE de <i>T. cruzi</i> da cepa G.	59
<b>Figura 16</b>	Ensaio de imunofluorescência com TCT de <i>T. cruzi</i> cepa G.	60
<b>Figura 17</b>	Ensaio de imunofluorescência com macrófagos tratados com drogas inibidoras das vias de sinalização e AE opsonizados.	61
<b>Figura 18</b>	Ensaio de imunofluorescência com macrófagos tratados com drogas inibidoras das vias de sinalização e TCT opsonizados.	62
<b>Figura 19</b>	Resultado do ensaio de imunofluorescência com macrófagos, AE opsonizados e TCT opsonizados.	63
<b>Figura 20</b>	Resultados do ensaio de internalização dos AE vivos e mortos por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização.	64
<b>Figura 21</b>	Resultados do ensaio de internalização dos TCT vivos e mortos por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização.	65
<b>Figura 22</b>	Resultados do ensaio de fagocitose das partículas de zymosan por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização.	66
<b>Tabela 3</b>	Vias de sinalização celular ativadas em macrófagos por <i>T. cruzi</i> cepa G e partículas de zymosan	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>µg</b>	Microgramas
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µM</b>	Micromolar
<b>TBST</b>	Tris-Buffered Saline e Tween 20
<b>TBST5%</b>	Tris-Buffered Saline, Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AE</b>	Amastigotas extracelulares
<b>AKT</b>	Proteína quinase B
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BB</b>	Tampão de ligação sem Ureia
<b>BBU6</b>	Tampão de ligação com Ureia 6M
<b>BI10</b>	Tampão 1 com Imidazol 10mM
<b>BI300</b>	Tampão 3 com Imidazol 300mM
<b>BI40</b>	Tampão 2 com Imidazol 40mM
<b>CD</b>	Dicroísmo Circular
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilenoindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
<b>DMEM10%</b>	DMEM10% suplementado com 10% de soro fetal bovino
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EBU6</b>	Tampão de eluição com Ureia 6M
<b>ERK</b>	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
<b>FTS</b>	Ácido Farnesil Tiosalicílico
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HeLa</b>	Células do carcinoma epidermoide de colo de útero
<b>HEPES</b>	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
<b>IC50</b>	Concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática

<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IPTG</b>	Isopropylthio- $\beta$ -galactoside
<b>IP3</b>	Trifosfato de inositol
<b>ITAM</b>	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
<b>ITU</b>	Iodotubercidina
<b>kDa</b>	Quilo Dalton
<b>Ki</b>	Constante de inibição
<b>LB</b>	Meio Luria-Bertani
<b>LIT</b>	Liver Infusion Tryptose (meio de infusão de fígado contendo triptose)
<b>M</b>	Molar
<b>MARCK</b>	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases (proteína quinase ativada por mitógenos)
<b>MAPKK</b>	MAPK quinase (MAPK2)
<b>MAPKKK</b>	MAPKK quinase (MAPK3)
<b>MEK</b>	MAP kinase kinase ou MAPKK
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mTOR</b>	Mammalian target of rapamycin (alvo da rapamicina em mamíferos)
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OD</b>	Densidade óptica (absorbância)
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2
<b>PGN</b>	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% azida (NaN <sub>3</sub> )
<b>PGN- Sap</b>	Solução contendo PGN + 0,1% saponina
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase (fosfatidilinositol 3-quinase)
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato)
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato)
<b>PIP5K</b>	Phosphatidylinositol 5 kinase (fosfatidilinositol 5 kinase)
<b>PKC</b>	Protein kinase C (proteína quinase C)
<b>PLA</b>	Fosfolipase A
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>PPD</b>	Parafenilenodiamina

<b>RAS</b>	Rat sarcoma vírus
<b>RIFI</b>	Reação de imunofluorescência indireta
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>Ser</b>	Aminoácido serina
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>TCT</b>	Tripomastigotas de cultura de tecidos
<b>Thr</b>	Aminoácido treonina
<b>TRK</b>	Receptor tirosina quinase
<b>TRITC</b>	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i> (Tetrametil rodamina isotiocianato)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VERO</b>	Fibroblastos de rim de macaco verde da África
<b>WBU6</b>	Tampão de lavagem com Ureia 6M

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas - Aspectos gerais .....	15
1.2 P21-His <sub>6</sub> - Uma proteína recombinante baseada na P21 de <i>T. cruzi</i> e um alvo em potencial .....	17
1.3 Vias de sinalização celular .....	20
1.3.1 Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).....	22
1.3.2 Proteína quinase B (AKT).....	23
1.3.3 Proteína quinase ativada por mitógenos - MAPK .....	24
1.3.4 Quinase regulada por sinal extracelular – ERK2 .....	24
1.3.5 Proteína alvo da Rapamicina em mamíferos (mTOR) .....	25
1.3.6 p38 – Proteína quinase ativada por mitógenos (p38 <sup>MAPK</sup> ) .....	25
1.3.7 Rat sarcoma vírus (RAS).....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 Objetivos gerais.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Aspectos éticos e local do estudo.....	30
4.2 Animais .....	30
4.3 Cultura de células .....	30
4.4 Parasitas.....	31
4.5 Protocolos de purificação da P21-His <sub>6</sub> .....	32
4.5.1 Soluções tamponantes, meios de cultura, antibióticos e outros reagentes.....	32
4.5.2 Equipamentos .....	33
4.5.3 Protocolo de purificação e renovelamento da rnP21-His <sub>6</sub> .....	33
4.5.4 Protocolo de purificação da sP21-His <sub>6</sub> .....	34
4.6 Drogas inibidoras das vias de sinalização .....	35
4.7 Espectropolarimetria de dicroísmo circular da P21-His <sub>6</sub> .....	38
4.8 Obtenção de soro anti-sP21-His <sub>6</sub> e ensaio de imunofluorescência.....	39
4.9 Dot Blot.....	40
4.10 Western Blot.....	40
4.11 Ensaio de invasão em células não-fagocíticas.....	41
4.12 Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos para estudo das funções biológicas da sP21-His <sub>6</sub> .....	41

4.13 Ensaio de fagocitose para estudo da sinalização celular ativada pela rnP21-His <sub>6</sub> .....	42
4.14 Obtenção de soro com anticorpos policlonais anti- <i>T. cruzi</i> e ensaio de imunofluorescência ...	42
4.15 Ensaio de invasão para estudo da sinalização celular ativada pela cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	43
4.16 Ensaio de fagocitose para estudo da sinalização celular ativada em macrófagos por partículas de zymosan.....	45
4.17 Análise estatística.....	45
<b>5.0 RESULTADOS</b> .....	46
5.1 Purificação da P21-His <sub>6</sub> .....	46
5.2 Espectropolarimetria de dicroísmo circular da P21-His <sub>6</sub> .....	49
5.3 Ensaio de imunofluorescência da P21-His <sub>6</sub> .....	51
5.4 Dot Blot.....	52
5.5 Western Blot.....	53
5.6 Ensaio de invasão de células não-fagocíticas.....	53
5.7 Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan para estudo das funções biológicas da sP21-His <sub>6</sub> .....	55
5.8 Ensaio de fagocitose para estudo da sinalização celular ativada pela P21-His <sub>6</sub> .....	57
5.9 Ensaio de imunofluorescência: teste do soro contendo anticorpos policlonais anti- <i>T. cruzi</i> cepa G.....	59
5.10 Ensaio de invasão para estudo da sinalização celular ativada pela cepa G de <i>T. cruzi</i> .....	60
5.11 Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização. ....	65
<b>6.0 DISCUSSÃO</b> .....	68
6.1 O renovelamento da P21-His <sub>6</sub> gera uma proteína biologicamente ativa .....	68
6.2 Sinalização celular ativada durante a invasão de <i>T. cruzi</i> cepa G.....	72
6.2.1 Parasitas opsonizados.....	74
6.2.2 Parasitas vivos e mortos .....	78
<b>7.0 CONCLUSÕES</b> .....	84
<b>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
<b>ANEXO A</b> – Artigo Publicado na Revista Plos One.....	96
<b>ANEXO B</b> – Artigo Submetido à Revista Molecular & Biochemical Parasitology.....	97

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas - Aspectos gerais

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular que infecta humanos e outros hospedeiros, é o agente etiológico da Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, descoberta no início do século 20 por Carlos Chagas. A Doença de Chagas atualmente é considerada um dos principais problemas de saúde pública da América Latina e uma das doenças tropicais negligenciadas mais prevalentes com um grande impacto negativo na saúde pública deste continente (D'AVILA; TOLEDO; MELO, 2012; TODOROV et al., 2000).

Estima-se que aproximadamente 11 milhões de pessoas estejam infectadas, 120 milhões ocupem áreas consideradas de alto risco para a aquisição da doença e que outras 50.000 morrem todos os anos devido às complicações decorrentes das fases aguda e crônica da doença, sendo que a migração de indivíduos infectados provenientes de áreas endêmicas, assim como a falta de triagem nos bancos de sangue fez com que a Doença de Chagas se tornasse um problema de saúde pública também nos Estados Unidos e algumas áreas da Europa (NAKAYASU et al., 2009).

Atualmente não há nenhum tipo de vacina disponível e as drogas utilizadas no tratamento desta enfermidade apresentam efeitos colaterais indesejáveis, o que torna imprescindível a identificação de novos alvos terapêuticos como uma das mais desafiadoras metas no controle da Doença de Chagas (SMULSKI et al., 2010). A quimioterapia utilizada para o tratamento é baseada nos compostos nifurtimox e benznidazol, que não são muito eficazes, são mutagênicos, podem produzir reações adversas, efeitos tóxicos (CASTRO; MECCA; BARTEL, 2006; MOLL et al., 2007) e algumas cepas de *T. cruzi* são resistentes a essas drogas (MURTA et al., 1998).

O ciclo de vida do patógeno é complexo, ocorre com a participação de dois hospedeiros, um mamífero e o outro um inseto triatomíneo. Durante o ciclo o parasita apresenta três estágios de desenvolvimento: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Denomina-se metaciclogênese a transformação do estágio replicativo (epimastigota), para o estágio infectivo (tripomastigota metacíclico) ao longo do intestino do inseto vetor (SANTOS et al., 2009).

As formas epimastigota e amastigota correspondem aos estágios proliferativos encontrados em hospedeiros invertebrados e vertebrados respectivamente. A forma



tripomastigota é infectiva, invade diferentes tipos de células hospedeiras, sendo os macrófagos os primeiros a serem infectados no processo de replicação do parasita (TODOROV et al., 2000). A estratégia chave para o sucesso do parasita no processo de infecção dos hospedeiros mamíferos está na penetração de tripomastigotas metacíclicos nas células alvo (MANQUE et al., 2003).

No triatomíneo as formas epimastigotas replicam na porção média do intestino do inseto, enquanto que na porção mais distal eles se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectivos devido ao estresse nutricional que são submetidos nesta parte do intestino. Estas formas metacíclicas são expelidas juntamente com as fezes do triatomíneo durante seu repasto sanguíneo e chegam à corrente sanguínea seja por meio da picada do inseto, pela exposição ocular ou contato com a mucosa oral do hospedeiro, para em seguida infectar diferentes tipos de células. No interior das células os parasitas ficam envolvidos por um vacúolo parasitóforo, do qual escapam e mudam para a forma amastigota que replica livremente no citoplasma por divisão binária, após várias divisões os parasitas se diferenciam em tripomastigotas que são liberados no meio extracelular, atingem a corrente sanguínea, onde são novamente ingeridos pelo triatomíneo reiniciando o ciclo (NAKAYASU et al., 2009).

*T. cruzi* é capaz de invadir e replicar no interior de uma grande variedade de células nucleadas exibindo tropismo por cardiomiócitos e células musculares lisas do hospedeiro vertebrado (WOOLSEY et al., 2003). Segundo Burleigh e Andrews (1995) formas amastigotas do parasita foram encontradas na corrente sanguínea de camundongos durante a fase aguda da doença sugerindo a possibilidade de macrófagos terem internalizado amastigotas dando início a um subciclo alternativo do parasita no hospedeiro mamífero, o que representa um modo alternativo de propagação necessário à sobrevivência do parasita na presença de uma resposta citotóxica do hospedeiro, em que a lise das células infectadas levaria à libertação de formas amastigotas viáveis, casos de infecções de células não-fagocíticas por formas amastigotas também foram reportados (FERNANDES et al., 2006).

Além do ciclo clássico de transmissão, o parasita pode ser transmitido congenitamente, por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e mais recentemente por via oral. Segundo Yoshida (2008) ainda que a transmissão de *T. cruzi* tenha sido reduzida em alguns países da América Latina devido a medidas de controle e eliminação do triatomíneo vetor (*Triatoma infestans*) países que não adotaram tais medidas não apresentaram queda da transmissão e em alguns casos até aumentou, sendo que neste cenário a transmissão por via oral emergiu como um importante e permanente mecanismo de transmissão do parasita

através da ingestão de bebidas típicas (caldo de cana-de-açúcar, suco de açaí e suco de bacaba), rudimentarmente preparadas e que continham restos do inseto infectado esmagado durante a preparação, tal como aconteceu no Brasil nos estados de Santa Catarina (2005), no Pará e Amazônia (2006 e 2007), ocasionando mortes por Doença de Chagas.

A doença manifesta-se em duas principais fases: a aguda, caracterizada por altos índices de parasitemia (formas tripomastigotas) no sangue do hospedeiro, e a crônica, podendo apresentar-se nas formas cardíaca, digestiva ou ainda indeterminada (MOTT et al., 2009). As sintomatologias mais importantes são as disfunções cardíacas, como inflamação crônica, hipertrofia e fibrose, provocando insuficiência e lesões cardíacas, miocardiopatia, assim como disfunções gástricas como megacólon, megaesôfago, megaestômago, megaduodeno, megajejuno, dentre outras (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009).

O processo de invasão de uma célula hospedeira por *T. cruzi* pode ser dividido em três estágios: adesão e reconhecimento, sinalização, e invasão. A adesão envolve o reconhecimento e a interação entre as moléculas de superfície do parasita e da célula hospedeira. Diferentes cepas de *T. cruzi*, assim como diferentes formas do parasita (amastigotas, tripomastigotas de cultura de tecido e tripomastigotas metacíclicos) expressam diferentes moléculas em sua superfície, as quais interagem com componentes das células hospedeira durante a invasão. Além disso, não podemos excluir a possibilidade das moléculas secretadas pelo parasita também exercerem um papel fundamental na invasão (SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2010).

## **1.2 P21-His<sub>6</sub> - Uma proteína recombinante baseada na P21 de *T. cruzi* e um alvo em potencial**

A tecnologia do DNA recombinante disponibilizou várias técnicas simples e eficientes para a transferência e expressão de genes de interesse em uma célula estranha. Assim, pensava-se que por meio de fontes ilimitadas e baratas proteínas raras estariam mais facilmente acessíveis. Porém, observou-se que o tipo de célula hospedeira exerce uma grande influência na qualidade e quantidade da proteína recombinante produzida. A produção de uma proteína recombinante em células de mamíferos produz uma proteína biologicamente ativa, com todas as modificações pós-traducionais necessárias, mas possui um rendimento baixo em termos de quantidade de proteína recombinante produzida, requer um longo tempo de cultivo, utilização de biorreatores dispendiosos e meios de cultura especiais, todos esses pontos têm um grande impacto sobre os custos de produção. Por outro lado, os processos de cultivo que

se baseiam em células bacterianas requer meios mais baratos, o crescimento é rápido e fornece elevadas concentrações de células (VALLEJO; RINAS, 2004).

A tecnologia responsável pela expressão de proteínas recombinantes é altamente desenvolvida (WILLIS et al., 2005). A expressão de produtos recombinantes é um método essencial para a produção de proteínas-alvo e um dos processos mais importantes para a síntese de proteínas terapêuticas e estudos estruturais. Embora as bactérias representem um sistema de produção conveniente, a maioria dos polipeptídios recombinantes produzidos em hospedeiros procarióticos podem apresentar um renovelamento incompleto ou conter erros no processo de dobragem, que geralmente resultam no acúmulo de agregados insolúveis, conhecidos como corpos de inclusão (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011).

Os corpos de inclusão são agregados densos de polipeptídios anormalmente enovelados. Eles são formados intracelularmente por causa das características de agregação da proteína ou devido à incapacidade dos processos celulares de assegurarem que o polipeptídio expresso seja solúvel e dobrado corretamente. Considera-se a formação de corpos de inclusão um equilíbrio dinâmico entre a adição e remoção de proteínas parcialmente dobradas a partir do agregado, com a força motriz resultante frequentemente direcionada ao estado insolúvel. A possibilidade de formação de corpos de inclusão está condicionada à interação entre os sistemas de processamento moleculares das células e os controladores termodinâmicos que provocam a associação do polipeptídio. Os corpos de inclusão estão normalmente localizados no citoplasma bacteriano, embora as proteínas secretadas possam formar corpos de inclusão, no espaço periplasmático (MIDDELBERG, 2002).

A expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* (*E. coli*) é amplamente utilizada na produção de proteínas em grandes quantidades devido às suas vantagens, tais como crescimento em fontes de carbono de baixo custo, rápida acumulação de biomassa, receptividade à fermentação com alta densidade celular e facilidade de produção em escala crescente. Entre 8048 alvos clonados em *E. coli*, apenas cerca de 30% deles foram expressos na forma solúvel, enquanto o restante foi degradado e se converteram em corpos de inclusão. Embora os corpos de inclusão não possam ser diretamente utilizados para estudos de funções biológicas das proteínas, a sua insolubilidade fornece uma fonte fácil de proteína relativamente pura, se essas proteínas puderem ser convertidas para a sua conformação nativa e ativa (YANG et al., 2011).

Expressar proteínas em *E. coli* é mais conveniente e o uso dos corpos de inclusão requer que eles sejam solubilizados e redobrados numa conformação ativa. Há duas questões importantes na recuperação de proteínas ativas a partir dos corpos de inclusão, a solubilização

e o renovelamento. A solubilização deve promover a dispersão monomolecular da proteína liberando as interações intra ou inter-cadeia. A escolha de agentes de solubilização como ureia, cloridrato de guanidina, ou detergentes, desempenha um papel essencial na eficiência de solubilização, na estrutura das proteínas no estado desnaturado, e no subsequente renovelamento (TSUMOTO et al., 2003).

Historicamente, a otimização da expressão de proteínas solúveis foi a primeira estratégia na obtenção de proteínas para estudos estruturais. Sendo que o renovelamento da proteína insolúvel era uma estratégia frequentemente usada como último recurso, devido à natureza imprevisível do resultado e do longo tempo gasto no processo de renovelamento. No entanto, a literatura mostra que numerosas proteínas podem ser redobradas nas suas formas ativas (WILLIS et al., 2005).

É necessário desenvolver protocolos eficientes para a solubilização e renovelamento de proteínas recombinantes a partir dos corpos de inclusão. O renovelamento é tipicamente efetuado utilizando uma simples diluição em condições de renovelamento adequadas, diálise ou em uma coluna de cromatografia. Encontrar condições adequadas de renovelamento é geralmente o passo mais difícil do processo de purificação (RAGHAVA, 2008).

O repertório de técnicas de renovelamento está crescendo continuamente como métodos de expressão de proteínas de médio a alto rendimento, capazes de gerar novas proteínas a uma taxa crescente. A fim de explorar essa riqueza de dados, um repositório central para a expressão de proteínas e renovelamento é imprescindível. Tradicionalmente, os experimentos de renovelamento são realizados em uma base individual de proteínas e são publicados de forma não-padronizada. Isso representa um sério desafio para a recuperação de dados e análises (CHOW et al., 2006).

Para melhorar ainda mais a eficiência do processo de purificação de proteínas por cromatografia de afinidade foram desenvolvidas abordagens em que quelantes metálicos ou ligantes específicos foram imobilizados em resinas ativadas e utilizadas para ligar seletivamente e separar as proteínas-alvo. A incorporação posterior de caudas específicas nas proteínas de interesse mudou a cromatografia de afinidade partindo de uma técnica exótica para um protocolo de purificação de rotina. Agora, as colunas projetadas especificamente para reconhecer essas caudas associadas tornaram-se o método de escolha, cumprindo a promessa de purificar uma proteína homogênea a partir do extrato bruto de células em uma etapa (CAMPER; VIOLA, 2009).

A P21-His<sub>6</sub> é uma proteína recombinante baseada na forma nativa da proteína secretada por *T. cruzi*, a qual teve o gene clonado e a proteína recombinante caracterizada por

Silva et al. (2009), mas seu papel na interação parasita-hospedeiro não está completamente esclarecido. Recentemente realizamos vários experimentos em nosso laboratório para explorar as possibilidades biológicas oferecidas por essa proteína, observamos que a P21-His<sub>6</sub> tem a capacidade de aumentar a fagocitose inespecífica de alguns parasitas intracelulares e também de estimular a fagocitose de partículas de zymosan (RODRIGUES et al., 2012).

Antes de explorar todas as características e atividades biológicas da P21-His<sub>6</sub>, Silva et al. (2009) clonou e amplificou o gene da proteína nativa secretada pelo parasita, inseriu num vetor pET28a(+) e promoveu a transformação da *E. coli* BL21 para expressar essa proteína recombinante. Atualmente dispomos de dois protocolos de purificação da P21-His<sub>6</sub>, dos quais purificamos a proteína a partir das frações distintas do extrato bacteriano, na fração insolúvel obtemos a forma renovelada da proteína a partir dos corpos de inclusão, a qual chamamos aqui de rnP21-His<sub>6</sub>, a partir da fração solúvel desse extrato obtemos a forma solúvel, a sP21-His<sub>6</sub>.

Já sabemos muito sobre a P21-His<sub>6</sub>, mas as respostas que obtemos geram novos questionamentos que precisam ser esclarecidos para compreendermos o universo de possibilidades oferecidas por essa proteína. O renovelamento da proteína ocorre de forma correta? Qual protocolo de purificação é mais viável para laboratórios com recursos limitados? A forma solúvel possui as mesmas funções biológicas que já observamos trabalhando com a proteína insolúvel? E quais as vias de sinalização celular ativadas na célula hospedeira por essa proteína? Essas são algumas das dúvidas que buscamos esclarecer neste trabalho.

### **1.3 Vias de sinalização celular**

O presente estudo, além de investigar as vias de sinalização ativadas pela proteína P21-His<sub>6</sub>, também investigou as vias de transdução de sinais que são ativadas na invasão de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 por amastigotas extracelulares (AE) e tripomastigotas de cultura de tecidos (TCT) da cepa G de *T. cruzi* nas situações em que os parasitas estão vivos, mortos e também opsonizados com um soro contendo anticorpos policlonais de camundongos que foram imunizados contra este parasita. Para este estudo, antes da invasão pelos parasitas tratamos as células hospedeiras com drogas inibidoras das vias de sinalização seguindo as especificações de cada fabricante no uso destas drogas.

A invasão celular por patógenos intracelulares representa um evento complexo, usualmente envolvendo um ligante codificado pelo patógeno e um receptor na célula hospedeira (BEACHEY, 1981). Evidências recentes indicam que em várias instâncias a característica chave do processo de invasão envolve a sinalização entre patógenos e células hospedeiras. Os primeiros “insights” sobre a complexidade dos eventos de transdução de sinais, desencadeados em células de mamíferos devido à sua interação com patógenos, tiveram início no estudo com bactérias entéricas. Entretanto, outras evidências indicam que a sinalização exerce também um papel importante na interação entre parasitas protozoários e suas células hospedeiras (CALER et al., 1998).

Neste contexto, a superfície celular é crucial no estabelecimento de qualquer relação parasita-hospedeiro e a identificação das moléculas envolvidas neste processo torna-se um passo obrigatório. A infectividade de tripomastigotas metacíclicos de diferentes amostras de *T. cruzi* tem sido associada com a expressão diferencial de proteínas de superfície (RAMIREZ et al., 1993; RUIZ et al. 1998). O parasita liga-se a receptores na superfície da célula hospedeira, é internalizado e logo escapa para o citosol onde ele se diferencia, replica, cresce e espalha a infecção para as células vizinhas através da matriz extracelular e para células distantes através da circulação (CHUENKOVA; PERRIN, 2008).

Evidências experimentais permitiram estabelecer que *T. cruzi* desenvolve mecanismos efetivos para escapar da ação lítica do sistema complemento de mamíferos. Foi observado que tripomastigotas possuem moléculas de superfície que inibem a formação de C3 convertases, essenciais à ativação do sistema complemento e, portanto, resistem à lise (KIPNIS et al., 1981; JOINER et al., 1986; SCHENKMAN; GHUTER; YOSHIDA, 1986). Entretanto, tripomastigotas podem ser lisados na presença de soro imune de animais infectados (KRETTLI; BRENER, 1982).

Modificações na via de sinalização do receptor  $\beta$  do fator de crescimento e também a ativação de vias dependentes de cálcio são estratégias essenciais usadas no processo de invasão do parasita (TODOROV et al., 2000). Alguns estudos mostram que a invasão de células de mamíferos por *T. cruzi* requer a ativação das vias de transdução de sinal relacionadas com o aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  no parasita e na célula hospedeira (NEIRA; FERREIRA; YOSHIDA, 2002).

Curiosamente as células sobrevivem por um longo período, apesar da infecção pelo parasita, pouco ou quase nada se sabe sobre o motivo pelo qual as células sobrevivem tanto tempo, abrigando uma grande quantidade de parasitas que necessitam de espaço, nutrientes e outros fatores para se replicarem. A resposta parece estar relacionada às vias de sinalização,

alguns fatores neurotróficos derivados do parasita são capazes de se ligar a receptores tirosina quinase (TRKA e TRKC) relacionados com o desenvolvimento e reparo do sistema nervoso e por meio de um mecanismo *downstream* envolvendo a vias da PI3K e AKT, ocorre um aumento da sobrevivência celular, da proliferação, tamanho, disponibilidade de nutrientes e outros fatores necessário para a sobrevivência e homeostasia celular (CHUENKOVA; PERRIN, 2008).

A invasão por *T. cruzi* é capaz de induzir tanto a fosforilação de proteínas dos macrófagos pela tirosina quinase, quanto de ativar a via de sinalização dependente da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Assim, o bloqueio da via de sinalização dependente da tirosina quinase e também MAPK nos macrófagos hospedeiros, utilizando os inibidores das respectivas vias pode abortar a infecção destas células pelo parasita, sugerindo que a ativação das vias dependentes de quinases é um importante evento no processo de invasão (TODOROV et al., 2000).

Elucidar os componentes moleculares reguladores da complexa interação entre o parasita e os alvos celulares é imprescindível para o entendimento da patologia da Doença de Chagas. Vários estudos tem examinado a dependência de *T. cruzi* da ativação das vias de sinalização e respostas transcricionais utilizando ampla variedade de tipos celulares diferentes em experimentos que buscam elucidar as bases moleculares e celulares da resposta celular à invasão em modelos *in vitro*. Os resultados destes estudos sugerem que vários mecanismos de sinalização celular estão envolvidos na sobrevivência e resposta da célula hospedeira à invasão do parasita (AOKI et al., 2006).

A invasão das células por *T. cruzi* também parece desencadear um incomum mecanismo que envolve o recrutamento e fusão de lisossomos da célula hospedeira para o sítio de invasão, sugerindo que este parasita também interage com sistemas de sinalização que regulam o tráfego de membrana (TODOROV et al., 2000).

### **1.3.1 Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)**

Todos os tipos de células eucarióticas estudadas até o presente possuem esta via de sinalização, ela está relacionada a um conjunto extraordinariamente diversificado de funções celulares primordiais incluindo crescimento celular, proliferação, motilidade, diferenciação, sobrevivência e tráfego intracelular (BAO et al. 2008).

A PI3K pertence a uma grande família de enzimas que são divididas em três grupos funcionais baseado nos seus domínios proteicos estruturais, substrato lipídico específico e

propriedades reguladoras. A classe I da PI3K foram as primeiras identificadas e são importantes componentes das vias de sinalização que regulam o crescimento das células eucarióticas. A classe II são pouco conhecidas, mas também parecem estar relacionadas à regulação do crescimento celular e também regular a endocitose mediada por clatrina. A classe III reúne algumas proteínas relacionadas com vacúolos/lisossomos de leveduras e seus homólogos pertencentes a outros eucariotos, esta classe parece estar envolvida em vários outros eventos de transporte através da membrana, incluindo endocitose, acidificação de vesículas e autofagia (SCHOIJET et al., 2008).

A PI3K regula as redes de sinalização celular envolvidas em processos ligados a sobrevivência, crescimento, proliferação, metabolismo e outras funções especializadas e diferenciadas das células. A subversão desta via é comum em casos de câncer e está relacionada a outras desordens inflamatórias, a elucidação das funções biológicas da PI3K vieram dos estudos farmacológicos que utilizaram enzimas inibidoras desta via de sinalização, como wortmanina e LY294002 (GHARBI et al., 2007).

### **1.3.2 Proteína quinase B (AKT)**

AKT é uma serina/treonina quinase recrutada para a membrana plasmática de células estimuladas por uma ampla variedade de estímulos como fatores de crescimento e citocinas. O recrutamento de AKT para a membrana requer a associação do domínio PH (Pleckstrin Homology) de AKT com o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), um produto da enzima PI3K, o que resulta na fosforilação e ativação de AKT, que exerce importantes papéis em múltiplos processos celulares como regulação do ciclo celular, sobrevivência celular, remodelamento do citoesqueleto de actina e migração celular (RAJARAM et al., 2006).

AKT1, AKT2 e AKT3 são importantes mediadores das vias de transdução de sinais relacionadas com a ativação de receptores tirosina quinase e PI3K. A ativação de AKT promove a sobrevivência da célula por inibir a função das proteínas apoptóticas, particularmente Bcl-2. A AKT interfere diretamente com a cascata de sinalização da caspase por fosforilar a pro-caspase-9 tornando-a inativa, inibindo assim a ativação das caspases efetoras, quando ativada promove a sobrevivência celular através de interações com outras cascatas de sinalização tais como NF-κB, MAPKs, JNK e p38. Finalmente, a ativação de AKT aumenta a sobrevivência celular por aumentar a absorção de nutrientes, o metabolismo e por manter o potencial de membrana da mitocôndria (CHUENKOVA; PERRIN, 2008).



### 1.3.3 Proteína quinase ativada por mitógenos - MAPK

Diversos estímulos celulares incluindo fatores de crescimento, hormônios, choque osmolar, estresse e elevação da temperatura resultam na ativação da cascata de sinalização da MAPK, algumas vezes também conhecida como quinase regulada por sinal extracelular (ERK). As MAPKs compreendem uma família de proteínas quinases relacionadas que são ativadas umas pelas outras por fosforilação nos resíduos de tirosina e treonina. Embora a via de sinalização da MAPK seja ativada sob muitas circunstâncias em culturas de células, o exato papel desta via *in vivo* permanece indefinido (DUDLEY et al., 1995).

As MAPKs formam vias de sinalização intracelular compostas por três componentes: a MAPK, a MAPK quinase (MAPKK ou MAP2K) e a MAPKK quinase (MAPKKK ou MAP3K), cujas funções e estruturas foram conservadas ao longo da evolução desde organismos unicelulares, como as leveduras, até organismos complexos, como os mamíferos. Elas são ativadas por numerosos mecanismos de estresse celular e por receptores que respondem a determinados ligantes e desempenham papéis cruciais na regulação de funções essenciais da célula, como sobrevivência, proliferação, diferenciação, morte, além de estar relacionadas também a várias doenças humanas (RUNCHEL; MATSUZAWA; ICHIJO, 2011).

### 1.3.4 Quinase regulada por sinal extracelular – ERK2

ERK1 e ERK2 foram as primeiras MAPKs identificadas, elas têm sido extensivamente caracterizadas devido às suas diversas funções fisiológicas e também por estarem envolvidas em uma série de doenças. Como o próprio nome indica a ativação desta via é iniciada através do reconhecimento de um ligante pelo receptor tirosina quinase na membrana plasmática, levando à ativação da proteína G. ERK 1 e 2 fosforilam um grande número de substratos levando a uma resposta celular apropriada, vários componentes básicos de outras vias de sinalização foram atribuídos como capazes de ativar ERK1/2, incluindo outros receptores tirosina quinases, quinases Src, cálcio, proteína quinase C e receptores acoplados à proteína G (RUNCHEL; MATSUZAWA; ICHIJO, 2011).

ERK2 é uma proteína quinase amplamente distribuída, possui atividade máxima quando seus resíduos de Thr183 e Tyr185 são fosforilados pela MAPKK ou MEK1. Após sua ativação ERK2 fosforila muitas proteínas reguladoras, proteínas quinase e fatores de transcrição (FOX et al., 1998).

### **1.3.5 Proteína alvo da Rapamicina em mamíferos (mTOR)**

A mTOR é uma Serina/Treonina proteína quinase que controla o crescimento celular, proliferação e sobrevivência. A sinalização de mTOR está implicada no desenvolvimento do câncer, por isso existe um grande interesse em desenvolver drogas que atuem nesta proteína. O entendimento desta via de sinalização foi facilitado enormemente com o uso da droga Rapamicina que inibe as funções mTOR (BALLOU; LIN, 2008).

A mTOR exerce um papel central no controle do crescimento e metabolismo celular, foi originalmente descoberta em leveduras, mas é bastante comum e conservada em todos os eucariotos como plantas, helmintos, moscas e principalmente mamíferos. Controla o crescimento em resposta à disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e ATP. Sua via ativa o crescimento celular por regulação positiva ou negativa através de vários processos anabólicos ou catabólicos respectivamente, que coletivamente determina o acúmulo de massa. Além de mTOR ser um importante controlador do crescimento celular dependente de ciclinas e quinases, também regula e controla a divisão celular (HALL, 2008).

### **1.3.6 p38 – Proteína quinase ativada por mitógenos (p38<sup>MAPK</sup>)**

A família das MAPKs controla um número enorme de processos celulares como expressão, metabolismo, proliferação celular, divisão e diferenciação celular, apoptose e embriogênese. A p38 é uma MAPK cuja via de sinalização foi inicialmente descrita como sendo ativada por diferentes tipos de estresse celular e citocinas, vários estudos mostram o envolvimento da via de p38 em um amplo espectro de processos celulares, desde o ciclo celular, apoptose, senescência, regulação do splicing do RNA, formação de tumores e crescimento/diferenciação de tipos específicos de células (BHANDARI et al., 2010).

A p38 é uma subfamília altamente conservada de MAPKs, reúne um grupo de moléculas que são importantes mediadoras da resposta celular a uma grande variedade de estímulos ambientais estressantes, como radiação ultravioleta, estresse oxidativo, calor, choque osmótico, lipopolissacarídeos de bactérias e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a p38 exerce funções essenciais em muitos processos biológicos como crescimento celular, proliferação, diferenciação, senescência, morte, cicatrização de feridas, resposta inflamatória e metabolismo energético (GONG et al., 2010).

### 1.3.7 Rat sarcoma vírus (RAS)

Oncoproteínas Ras são comumente encontradas em muitos tipos de tumores humanos, contribuem para desregular o crescimento celular, a diferenciação e morte celular. Transformações malignas induzidas por Ras e a manutenção do fenótipo alterado requer a associação de Ras com a superfície interna da membrana celular, esta associação é promovida pela COOH-terminal farnesil cisteína carboximetil ester comum em todas as proteínas Ras. Quando a farnesilação é bloqueada, seja por mutações em resíduos de cisteína modificados pela enzima farnesil transferase, seja por ação de inibidores da farnesil transferase, a proteína Ras permanece no citosol e perde sua atividade (GANA-WEISZ et al., 2002).

As proteínas Ras são expressas em quase todos os tecidos adultos e fetais agindo como interruptores moleculares ativando vias de transdução de sinais que regulam a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência. Ao se ligarem à superfície interna da membrana celular são ativadas por receptores que induzem a conversão de sua forma inativa (guanosina difosfato – GDP) para a forma ativa Ras-GTP, a superexpressão de Ras causa proliferação e crescimento de tumores (NEVO et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

A proteína recombinante de *T. cruzi* P21-His<sub>6</sub> pode ser purificada a partir dos corpos de inclusão (rnP21-His<sub>6</sub>) e a partir da fração solúvel do extrato bacteriano (sP21-His<sub>6</sub>) utilizando protocolos distintos, com este trabalho planejamos comparar as proteínas obtidas por cada protocolo e verificar se possuem a mesma estrutura secundária, propriedades biológicas e identificar as vias de sinalização ativadas pela proteína.

Ainda neste trabalho planejamos identificar as vias de sinalização envolvidas durante a invasão de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 por formas TCT e AE da cepa G de *T. cruzi*, nas situações em que os parasitas estão vivos, mortos ou opsonizados.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Verificar se a rnP21-His<sub>6</sub> e a sP21-His<sub>6</sub> possuem a mesma estrutura secundária.
2. Verificar se a sP21-His<sub>6</sub> promove o aumento da fagocitose por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6.
3. Verificar se a sP21-His<sub>6</sub> promove aumento da internalização das formas TCT e AE da cepa CL de *T. cruzi* em células não-fagocíticas (Vero).
4. Identificar as vias de sinalização ativadas pela rnP21-His<sub>6</sub> durante o processo de fagocitose por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6.
5. Identificar as vias de sinalização ativadas no processo de invasão celular de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 por TCT e AE da cepa G de *T. cruzi* nas situações em que eles estão vivos, mortos ou opsonizados.

### 3. JUSTIFICATIVA

Investigar diferentes aspectos da interação entre *T. cruzi* e a célula hospedeira é como buscar pequenas peças que faltam de um enorme quebra-cabeça que está longe de ser finalizado. Carlos Chagas deu aos pesquisadores a visão geral de todo o quadro, seus esforços dedicados à compreensão de todo o ciclo de transmissão do parasita com toda certeza ultrapassaram vários limites existentes no seu tempo, mesmo apesar das limitações tecnológicas da época. Porém, decorridos vários anos desde as primeiras descobertas de Carlos Chagas, os pesquisadores da atualidade se deparam com inúmeros questionamentos mais complexos e novos limites para serem ultrapassados, mesmo dispondo dos modernos recursos tecnológicos existentes neste século.

Estudar a interação parasita-célula hospedeira é buscar compreender o “diálogo” bioquímico e molecular que se estabelece entre estes organismos, traduzir esta linguagem é de fundamental relevância para que os pesquisadores possam compreender quais artifícios o parasita utiliza no processo de invasão e quais são usados para burlar as defesas da célula hospedeira, deixando-a tão suscetível à invasão do parasita. A chave desta complexa gramática molecular pode estar no entendimento das vias de sinalização envolvidas neste processo e na caracterização das proteínas de superfície ou secretadas pelo parasita. Afinal, os sinais para que *T. cruzi* entre e sobreviva no interior das células não são completamente esclarecidos e algumas evidências sugerem que o parasita interaja com diferentes sistemas de sinalização da célula hospedeira (TODOROV et al. 2000).

O diálogo entre *T. cruzi* e os componentes do citosol da célula hospedeira é fundamental para a sobrevivência do parasita, para a difusão e manutenção da infecção em hospedeiros mamíferos, no entanto, a base molecular subjacente à interação do parasita com o meio intracelular também permanece largamente inexplorada (CHUENKOVA; PERRIN, 2008).

Compreender as vias de sinalização e as proteínas envolvidas na invasão celular pelo parasita é um trabalho árduo que poderá ser gratificante e render bons resultados. Árduo pela sua complexidade e principalmente devido à quantidade de novos questionamentos que deverão surgir a partir do entendimento destas vias. Gratificante porque despertará ainda mais o interesse dos pesquisadores em investigar, identificar e caracterizar os elementos do parasita que ativam estas vias de sinalização e quais receptores da célula hospedeira são recrutados por estes elementos. Pois, *T. cruzi* liga-se a receptores na superfície das células do hospedeiro, o que leva à sua internalização no vacúolo parasitóforo (CHUENKOVA; PERRIN, 2008).

Atualmente os agentes terapêuticos disponíveis para tratamento da doença provocada por *T. cruzi* são altamente tóxicos, no momento não há nenhum tratamento efetivo para a Doença de Chagas em estágio crônico, por isso entender a biologia básica deste parasita é essencial para o desenvolvimento de novos alvos para tratamento (BAO et al., 2008).

Identificar as proteínas do parasita, os receptores da célula hospedeira, assim como compreender a cascata de sinalização envolvida poderá abrir um leque de possibilidades de alvos terapêuticos com a finalidade de interromper o ciclo de invasão do parasita a nível celular. Afinal, é sabido que a ativação de vias de sinalização da célula hospedeira por *T. cruzi* é conhecida por desempenhar um papel regulador crucial no processo de invasão celular por este patógeno (WOOLSEY et al., 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos e local do estudo

Este estudo foi realizado respeitando-se todas as normas de biossegurança e está vinculado ao projeto: “Estudos de moléculas envolvidas na invasão e tráfego intracelular das formas infectivas de *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*. Emprego da P21 na indução de proteção contra a doença de Chagas”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo número 059/08).

Os procedimentos experimentais foram conduzidos em sua maior parte no Laboratório de Tripanosomatídeos (Bloco 6T sala 07) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ICBIM – UFU). Também realizamos vários experimentos e análises no Instituto de Física de São Carlos-SP da Universidade de São Paulo (USP) sob supervisão do Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo e colaboração da Doutoranda Heline Hellen Teixeira Moreira, e Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DMIP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob supervisão do Prof. Dr. Renato Arruda Mortara e colaboração do Prof. Dr. Fernando Real.

### 4.2 Animais

Utilizamos camundongos C57BL/6 e BALB/C, os quais foram cuidados, manipulados e sacrificados conforme as normas estabelecidas. Os animais foram mantidos no Biotério da UFU em condições padrões de 12 horas de luz e 12 horas no escuro, em temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ração e água sendo repostos sempre que necessário.

### 4.3 Cultura de células

Para execução deste estudo trabalhamos com dois tipos de células: macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 foram utilizados nos estudos de sinalização celular durante a invasão pela cepa G de *T. cruzi* e sinalização celular ativada pela proteína P21-His<sub>6</sub> durante a fagocitose de partículas de zymosan; células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde da África) foram utilizadas na manutenção do ciclo de *T. cruzi* *in vitro* para obter as formas TCT do parasita, e nos ensaios de invasão pela cepa CL de *T. cruzi*

quando foi necessário trabalhar com um tipo de célula não-fagocítica para estudar a capacidade da sP21-His<sub>6</sub> de induzir a fagocitose e aumentar a internalização do parasita.

Os macrófagos peritoneais foram colhidos na cavidade abdominal dos animais após 72 horas da administração prévia de solução de tioglicolato 3% estéril intra-abdominal em camundongos C57BL/6, sacrificados por deslocamento cervical. Com seringas de 5 ml e agulhas estéreis injetamos 5 ml de meio DMEM10% na cavidade peritoneal de cada camundongo, no interior da cavidade a solução foi levemente agitada para soltar os macrófagos da parede do peritônio, o lavado peritoneal contendo macrófagos foi aspirado da cavidade com uma seringa estéril e depositado num tubo Falcon estéril mantido temporariamente no gelo para evitar a aderência das células na parede do frasco. Para a determinação do número de células presentes no lavado peritoneal elas foram contadas utilizando câmara de Neubauer e posteriormente plaqueadas, em ambiente estéril, numa placa de 24 poços com lamínulas circulares, para a realização dos ensaios usamos  $2 \times 10^5$  células por poço.

Todas as células foram mantidas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium - Vitrocell/Embriolife), com L-glutamina (2mM) e D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio (1100 mg/L), suplementado com os antibióticos penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L) e estreptomicina (10 mg/L), e com soro fetal bovino (SFB - Vitrocell/Embriolife) a 10%, e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram avaliadas diariamente e o meio substituído sempre que necessário.

#### 4.4 Parasitas

*T. cruzi* das cepas G e CL (TCT e AE), foram usados nos ensaios de invasão de macrófagos peritoneais e invasão de células não-fagocíticas (Vero) respectivamente. Até sua utilização nos experimentos eles foram mantidos *in vitro* em células Vero, cultivadas em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup> contendo 10 ml de meio DMEM com 2,5% de SFB, até ocorrer a eclosão dos parasitas na sua forma TCT. As formas AE foram obtidas incubando-se os TCT em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) pH 5.8, suplementado com 5% SFB, por 16 a 18 horas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente foram centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos, o meio LIT foi desprezado, o pellet dissolvido em DMEM para em seguida efetuar a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer.



## 4.5 Protocolos de purificação da P21-His<sub>6</sub>

### 4.5.1 Soluções tamponantes, meios de cultura, antibióticos e outros reagentes

- Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS): 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1L dd H<sub>2</sub>O, pH 7,4.
- Meio Luria Bertani (LB): 10g de Bacto-Triptona, 5g de Bacto-extrato de levedura, 10g de NaCl, 1L ddH<sub>2</sub>O, pH7,0.
- Meio 2xYT: 16g de Bacto-Peptona ou Triptona, 10g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1L ddH<sub>2</sub>O, pH 7,0.
- Solução de estoque de Ureia 6M.
- Tampão de Ligação sem Ureia (BB): Imidazol 5mM, NaCl 500mM, Tris pH 8.0 20mM, ddH<sub>2</sub>O;
- Tampão de Ligação com Ureia 6M (BBU6): Imidazol 5mM, NaCl 500mM, Tris pH 8.0 20mM, Ureia 6M;
- Tampão de Lavagem com Ureia 6M (WBU6): Imidazol 20mM, NaCl 500mM, Tris pH 8.0 20mM, Ureia 6M;
- Tampão de Eluição com Ureia 6M (EBU6): Imidazol 1M, NaCl 500mM, Tris pH 8.0 20mM, Ureia 6M;
- Solução de estoque de NaCl 4M.
- Solução de estoque de Tris 1M.
- Solução de estoque de Glicerol 50%.
- Tampão 1 (BI10): Tris 25mM, NaCl 300mM, Glicerol 5%, Imidazol 10mM, ddH<sub>2</sub>O, pH 8,8.
- Tampão 2 (BI40): Tris 25mM, NaCl 300mM, Glicerol 5%, Imidazol 40mM, ddH<sub>2</sub>O, pH 8,8.
- Tampão 3 (BI300): Tris 25mM, NaCl 300mM, Glicerol 5%, Imidazol 300mM, ddH<sub>2</sub>O, pH 8,8.
- Tampão GF: Tris 25mM, NaCl 150mM, pH 8,8.
- Tampão 1xTBST: Tris 50mM, NaCl 150mM, 10% Twen 20, ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4.
- Tampão 1xTBST 5% milk: Tris 50mM, NaCl 150mM, 10% Twen 20, ddH<sub>2</sub>O, 50g de leite em pó desnatado, pH 7,4.
- Canamicina (50µg/mL).
- Coluna de Ni-Sepharose (GE Healthcare).
- IPTG 1M (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, Invitrogen).
- Lisozima (50mg/mL, Sigma-Aldrich).

- Membrana de diálise 3,5 kDa.
- Adjuvante Completo de Freud (Sigma).
- Adjuvante Incompleto de Freud (Sigma).

#### 4.5.2 Equipamentos

Espectrofotômetro Microprocessor Single Beam UV-9200; *Shaker* New Brunswick Scientific Innova 4400/4430 Large-Capacity Stackable Incubator *Shaker*; Centrífuga 5810R Eppendorf; Centrífuga Sorvall RC 6 Plus, Sonicador Branson Sonifier 450; Coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare); Sistema Purificador AKTA GE Healthcare/Amersham Biosciences Purifier; Agitador magnético Stirrer; Thermo Scientific NanoDrop 2000; Tubos concentradores; Espectrômetro de Dicroísmo Circular Jasco 815 CD Spectrometer;

#### 4.5.3 Protocolo de purificação e renovelamento da rnP21-His<sub>6</sub>

A proteína recombinante P21-His<sub>6</sub> possui uma cauda de histidina. Proteínas que possuem caudas de histidina podem ser purificadas facilmente através de protocolos relativamente simples utilizando cromatografia de afinidade, como por exemplo, coluna de níquel. A cauda de histidina é relativamente pequena e não interfere de forma sensível nas propriedades da proteína.

O protocolo de purificação e renovelamento da P21-His<sub>6</sub> utilizado neste trabalho é o mesmo que foi descrito por Silva et al. (2009). Em que o vetor pET-28a (+) contendo o gene completo para a forma nativa da proteína P21 de *T. cruzi* foi transfectado em *E. coli* BL21. Uma colônia simples foi colhida e inoculada num frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 ml de meio LB estéril, onde adicionamos 7µL do antibiótico Canamicina (50µg/mL). O frasco foi deixado sob agitação no *shaker overnight* a 37°C, este é o pré-inóculo.

No dia seguinte o pré-inóculo foi vertido num Frasco Erlenmeyer de 1L contendo 490 mL de meio LB estéril e 350 µL de Canamicina. O frasco foi deixado no *shaker* sob agitação contínua a uma temperatura de 37°C até atingir a densidade óptica (OD) de aproximadamente 0,5 a 0,9 aferida no espectrofotômetro. Para estimular a produção da proteína recombinante acrescentamos IPTG 1M de modo que a concentração final fosse de 0,5mM, deixamos o frasco no *shaker* sob agitação contínua por três horas.

Posteriormente os 500 mL de meio LB foram centrifugados a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi autoclavado e descartado, e o pellet foi dissolvido em 10

ml de PBS. Para induzir a lise celular utilizamos Lisozima (50 µg/mL por 20 minutos) e fizemos sonicação no extrato bacteriano, usando o Sonicador Branson Sonifier 450, durante seis ciclos de 30 segundos com um minuto de intervalo entre um ciclo e outro. O lisado bacteriano foi centrifugado a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet formado basicamente pelos corpos de inclusão foi dissolvido em solução de Ureia 6M.

Submetemos o lisado a cromatografia de afinidade usando coluna de Níquel. Usamos 2 mL de coluna, a qual foi lavada e equilibrada com água destilada e tampão de ligação por três vezes usando centrifugação a 2000 rpm por um minuto, desprezando o sobrenadante para remover os tampões indesejados. Em seguida, o lisado bacteriano foi incubado com a coluna de níquel, mantida sob agitação por duas horas a 4°C e centrifugada a 2000 rpm por um minuto.

Após centrifugação um pellet é formado pelas “beads” da coluna de Níquel com proteína P21-His<sub>6</sub> desenovelada ligada a elas pela cauda de histidina. A coluna foi lavada com BBU6 e depois com WBU6 três vezes com cada tampão, sendo centrifugada a 2000 rpm por um minuto a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida a coluna foi lavada com EBU6 quatro vezes através de centrifugação e dessa vez o sobrenadante proveniente de cada lavada é colhido, pois contém a proteína de interesse eluída. O propósito de lavar a coluna com estes três tampões um após o outro é que o BBU6, WBU6 e EBU6 apresentam concentrações crescentes de imidazol (5mM, 20mM e 1M respectivamente), isso faz com que a proteína seja eluída ao final do processo devido as beads da coluna de Níquel apresentarem uma afinidade maior pelo imidazol em relação à cauda de histidina da P21-His<sub>6</sub>.

Finalmente todo o eluído proveniente da lavagem com o EBU6 é inserido no interior de uma membrana de 3,5 kDa semipermeável e submetido a diálise contra 4L do tampão PBS por 48 horas sob agitação contínua a 4°C para remover impurezas e promover o renovelamento da P21-His<sub>6</sub>. O tampão PBS é repostado após o primeiro dia de diálise. Após a diálise a amostra purificada é aplicada num gel de eletroforese para confirmação da sua presença, pureza e a concentração da proteína quantificada com o aparelho Nanodrop.

#### **4.5.4 Protocolo de purificação da sP21-His<sub>6</sub>**

A maior parte da proteína sintetizada pela *E. coli* permanece na fração insolúvel, para obter uma quantidade razoável de proteína com este protocolo foi necessário preparar 8 litros de meio 2xYT. Uma colônia de *E. coli*, transfectada com o plasmídio que continha o gene da

P21-His<sub>6</sub>, foi inoculada em 100 mL de meio 2xYT estéril com 70µL de Canamicina (50µg/mL), este pré-inóculo foi deixado sob agitação contínua no *shaker* a 37°C *overnight*.

Preparamos 8 litros de meio 2xYT, dividimos o volume em oito Erlemeyers sendo que cada frasco ficou com um volume de um litro cada, autoclavamos todos os frascos e deixamos esfriar. Em seguida acrescentamos 700µL de Canamicina (50µg/mL) e um pouco do pré-inóculo com as bactérias crescidas em cada frasco, que foram deixados sob agitação contínua no *shaker* durante 2 horas a 37°C até atingir a OD de 0,6-0,8 aferida no espectrofotômetro a 600 nm. O indutor de síntese proteica IPTG a 1M foi adicionado em cada frasco de forma a deixar a concentração final de cada um a 0,5mM, para estimular a expressão da P21-His<sub>6</sub> pela *E. coli*, depois os frascos foram mantidos sob agitação por três horas a 37°C.

Todo o volume de meio 2xYT foi distribuído em frascos especiais e centrifugados na Sorvall RC-5C Plus High-Speed-Centrifuge a 4500rpm a 4°C por 40 minutos, o sobrenadante foi autoclavado e desprezado, e o pellet foi dissolvido no tampão BI10. Acrescentamos Lisozima (50 mg/mL, 160mL de pellet : 80 µL de Lisozima) para auxiliar na lise das bactérias, deixamos agir durante 20 minutos e sonicamos o lisado bacteriano por 8 ciclos, na potência máxima, com intervalo de um minuto entre cada ciclo. Após a sonicação centrifugamos o lisado a 14000rpm a 4°C durante quarenta minutos e coletamos o sobrenadante, que é a fração solúvel do extrato bacteriano.

A fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Níquel, sendo que a coluna foi previamente lavada com BI10 e depois com BI40 e posteriormente a proteína foi eluída da coluna após o uso do tampão BI300. Em seguida o eluído foi submetido a gel filtração utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL acoplada ao sistema de purificação AKTA Purifier (GE). Finalmente a proteína foi coletada e concentrada utilizando tubos concentradores centricom (MILLIPORE<sup>®</sup>) e centrifugação a 2700rpm.

#### **4.6 Drogas inibidoras das vias de sinalização**

Em farmacologia e bioquímica o IC<sub>50</sub> é um padrão que expressa a concentração necessária para uma droga produzir 50% do seu efeito/inibição. Porém uma dúvida muito comum de quem trabalha com drogas inibidoras das vias de sinalização é a concentração de uso que devemos adotar nos experimentos. A quantidade requerida de cada inibidor depende de muitos fatores como a acessibilidade do alvo, a permeabilidade celular, tempo de tratamento, tipo de célula usada. Consultar a literatura disponível é a melhor maneira de se determinar a concentração inicial. Porém, se os valores de Ki (constante de inibição) ou IC<sub>50</sub>

forem conhecidos deve-se usar uma concentração cinco a dez vezes maior para obtermos a máxima atividade da droga (Calbiochem<sup>®</sup> Inhibitor Sourcebook).

LY294005 ou C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>, também conhecido como 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, é um potente inibidor da PI3K sendo permeável à membrana celular agindo no sítio de ligação ao ATP da enzima. A via PI3K é amplamente estudada por sua capacidade de inibir a apoptose e regular as respostas inflamatórias mediadas por TLR (InvivoGen<sup>®</sup>).

A droga LY294005 é um inibidor altamente seletivo da PI3K, possui um IC<sub>50</sub> de 0,43µg/mL/1,4µM e um peso molecular de 307,35 g/mol. Quando usada na concentração de 50µM inibe especificamente a atividade da PI3K, não afetando outras proteínas quinases como PI4 quinase, PKC ou MAP quinases. Esta droga é solúvel em DMSO e para ser usada em experimentos com células a cultura deve ser tratada previamente com a droga por no mínimo uma hora antes da estimulação (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>).

O inibidor de AKT/PKB 124005, também conhecido como 1L6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-sn-glycerocarbonate (C<sub>30</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub>), é permeável à membrana celular e inibe potencialmente e seletivamente a proteína quinase AKT/PKB, possui um IC<sub>50</sub> de 5µM e peso molecular de 578,8 g/mol (Calbiochem<sup>®</sup>). Graham et al. (2009) estudando a produção do ligante do receptor NFκB por linfócitos T, usou este inibidor na concentração de 25µM tratando as células por duas horas com essa droga.

O inibidor PD98059 é um potente e seletivo inibidor de MAP quinase quinase (também conhecido como MAPK/ERK quinase ou MEK quinase), ele desencadeia suas propriedades inibitórias ligando-se à MEK e prevenindo a fosforilação de ERK1/2 (p44/p42 MAPK) por MEK1/2. MAPK ERK1/2 está envolvida na produção de citocinas induzida por TLR (InvivoGen<sup>®</sup>). Esta droga também é conhecida como 2'-Amino-3'-methoxyflavone (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>), possui o peso molecular de 267,28g/mol, sendo permeável à membrana celular, bloqueia seletivamente a ativação de MEK inibindo assim a fosforilação e ativação da MAP quinase (Enzo Life Sciences<sup>®</sup>).

PD98059 inibe a ativação de MEK1 e MEK2 com concentrações de IC<sub>50</sub> em torno de 4µM e 50µM, respectivamente. Em experimentos com cultura de células recomenda-se tratar as células com 50µM deste inibidor por no mínimo uma hora, ele age *in vivo* como um inibidor altamente seletivo da ativação de MEK1 se ligando a formas inativas de MEK1 prevenindo sua ativação por ligantes como c-Raf (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>).

PD98059 foi identificado como o primeiro inibidor sintético da via de sinalização da MAPK, desde então tem sido extensivamente usado para identificar as funções biológicas da

ERK1/2. A droga se liga à forma inativa da MAPKK (MEK), que é a proteína quinase imediatamente acima da ERK1/2, prevenindo sua ativação por Raf-1 e outros ativadores (KIM; ABDELMEGEED; NOVAK, 2006).

Recentemente uma nova e mais potente droga inibidora de MEK foi desenvolvida, trata-se da U0126, que inibe a atividade enzimática de MEK1/2, pois PD98059 bloqueia a fosforilação de MEK1, mas não inibe eficientemente a atividade de MEK1 uma vez que ela já está fosforilada (NAMURA et al., 2001).

U0126 ( $C_{18}H_{16}N_6S_2$ ), também conhecido como (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis [2-minophenylthio] butadiene), peso molecular de 380,50g/mol, é um inibidor altamente seletivo de MEK1 e MEK2, quando comparado ao PD98059, com uma alta afinidade ao MEK1. Para experimentos com cultura de células recomenda-se tratá-las com 10 $\mu$ M de U0126 por trinta minutos a duas horas antes da estimulação (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>).

5-Iodotubercidina também conhecida como 4-Amido-5-iodo-7-( $\beta$ -D-ribofuranosyl) pyrrolo [2,3-d] pyrimidine ( $C_{11}H_{13}IN_4O_4$ ) tem peso molecular de 392,2g/mol. É um potente inibidor de adenosina quinase, caseína quinase, MAPK, proteína quinase A e também inibe fortemente a ERK2 (Calbiochem<sup>®</sup>). Em estudos *in vitro* usa-se 1 a 10 $\mu$ M de ITU para inibir a atividade desta enzima (PARKINSON; GEIGER, 1996). Os efeitos de ITU como inibidor de adenosina quinase foram estudados incubando-se as células com essa droga por 60 minutos (FLUCKIGER-ISLER; WALTER, 1993).

A Rapamicina é um macrolídeo bacteriano com atividade antifúngica e imunossupressora. Ela forma um complexo com a imunofilina FKBP12, o qual inibe a atividade da mTOR. Para experimentos com cultura de células recomenda-se tratá-las com 10nM deste inibidor por no mínimo uma hora antes da estimulação (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>). Essa droga, também é conhecida como Sirolimus ( $C_{51}H_{79}NO_{13}$ ), tem peso molecular de 914,2g/mol e costuma ser usada para prevenir rejeição de órgãos transplantados ou enxerto de medula óssea. Rapamicina sendo uma droga que inibe a sinalização de mTOR pode ser usada no tratamento de câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (Cayman Chemical<sup>®</sup>).

O inibidor 506121 p38MAPK ( $C_{23}H_{21}FN_4S$ ), também conhecido como (RS)-{4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-methylsulfonyl-3H-imidazol-4-yl] pyridin-2-yl}-(1-phenylethyl) amine], tem massa molecular de 404,5g/mol, é permeável à membrana celular e age como um potente, seletivo e reversível inibidor de p38 MAPK (Calbiochem<sup>®</sup>). Nos experimentos com cultura de células tratamos as culturas com 4 $\mu$ M deste inibidor, o que representa uma concentração dez vezes maior do que seu IC50 (0,38 $\mu$ M para p38 $\alpha$ ) por até duas horas.

O Ácido Farnesil Tiosalicílico (FTA) ou 2-[[[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]thio]-benzoic acid (C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>S) é um inibidor da via de sinalização de Ras, tem peso molecular de 358,5g/mol e age desalojando a proteína Ras da membrana celular deixando-o suscetível à degradação proteolítica (Cayman Chemical®). Alguns estudos *in vitro* mostram que FTA usando nas concentrações 50-100µM tem sido efetivo na supressão do crescimento de um grande número de tumores incluindo câncer de próstata e melanomas (AMOS et al., 2006).

Altas concentrações de FTA são necessárias para promover o desligamento da proteína Ras da membrana plasmática das células, este inibidor provocou uma redução específica e dose-dependente na quantidade de Ras em células de ratos, sendo que o efeito de FTA na localização de Ras nestas células foi examinado usando 5-50µM da droga sem que houvesse citotoxicidade. Portanto, para desacoplar a proteína Ras da membrana plasmática recomenda-se usar a droga na concentração de 50µM (HAKLAI et al., 1998).

A tabela a seguir lista as drogas inibidores das vias de sinalização que utilizamos neste estudo, assim como os parâmetros de uso preconizados pelos fabricantes e literatura científica.

**Tabela 1 – Inibidores das vias de sinalização**

<b>Inibidor</b>	<b>Via de Sinalização</b>	<b>Marca</b>	<b>Solução de Estoque</b>	<b>Concentração de uso</b>	<b>Tempo de tratamento</b>
LY 294002	PI3K	Cayman	10mM	50 µM	1-2h
PD98059	MEK1	Cell Signaling	20mM	50µM	1-2h
UO126	MEK1/2	Cell Signaling	10mM	10µM	1-2h
Rapamicina	mTOR	Cayman	10mg/mL	10nM	1-2h
FTA	Ras	Cayman	14mM	50µM	1-2h
ITU	ERK2	Santa Cruz	2,55mM	20µM	1-2h
124005	AKT	Calbiochem	1,7mM	25µM	1-2h
p38 506121	p38	Calbiochem	10mM	4µM	1-2h

*Fonte: Data sheet dos fabricantes/Calbiochem Inhibitor SourceBook*

#### **4.7 Espectropolarimetria de dicroísmo circular da P21-His<sub>6</sub>**

É um tipo de espectroscopia que utiliza a absorção diferenciada da luz polarizada circularmente no sentido horário e anti-horário, este fenômeno é empregado no estudo da

estrutura secundária das proteínas. Utilizando o Espectropolarímetro de Dicroísmo Circular Jasco 815 e cubetas de quartzo de 0,1 cm obtivemos os espectros das proteínas rnP21-His<sub>6</sub> e sP21-His<sub>6</sub> medidos a partir de 250nm até 190nm a 10nm/minuto. A proteína na concentração de 0,15mg/mL dissolvida em tampão 10mM de fosfato de Sódio pH 7.4 foi aquecida a partir de 37°C até 80°C e posteriormente resfriada até a temperatura inicial, o espectro foi gravado para analisar se a proteína recuperava a sua estrutura secundária.

No protocolo de renovelamento da rnP21-His<sub>6</sub> a diálise contra tampão PBS oferece as condições adequadas para o renovelamento da proteína após ser desnaturada por ureia. Empregamos a espectropolarimetria de dicroísmo circular para analisar duas situações: primeiro verificar a capacidade da proteína de recuperar sua estrutura secundária após ser desnaturada pelo calor; segundo comparar os espectros da rnP21-His<sub>6</sub> e sP21-His<sub>6</sub> e verificar se possuem ou não a mesma estrutura secundária.

#### **4.8 Obtenção de soro anti-sP21-His<sub>6</sub> e ensaio de imunofluorescência**

Para realizar mais análises comparando a rnP21-His<sub>6</sub> e sP21-His<sub>6</sub> tendo em vista enriquecer os resultados obtidos com o dicroísmo circular fizemos ensaios de Dot Blot e Western blot, mas para executá-los foi necessário obter um soro contendo anticorpos policlonais que fossem capazes de reconhecer e ligar à proteína recombinante.

Cinco camundongos BALB/C de vinte dias de idade foram submetidos a três imunizações consecutivas com intervalo de sete dias entre cada imunização. Cada animal recebeu 300µL de volume, via intraperitoneal, contendo a proporção de 1:1 de Adjuvante de Freud e sP21-His<sub>6</sub> na concentração de 50µg/mL. Na primeira imunização usamos Adjuvante Completo de Freud, nas seguintes usamos o Adjuvante Incompleto de Freud, sendo que após sete dias decorridos da terceira imunização os animais foram sacrificados, o sangue coletado por punção cardíaca e centrifugado a 2500rpm por cinco minutos para podermos coletar o soro com anticorpos policlonais.

Para confirmar se o soro dos animais imunizados continha anticorpos policlonais capazes de se ligar à sP21-His<sub>6</sub> e também à rnP21-His<sub>6</sub> realizamos ensaios de imunofluorescência, em que 40µg/mL das proteínas foram adsorvidas em poços numa lâmina de RIFI e deixadas à temperatura ambiente até secarem. Fixamos com formaldeído 4% nos poços durante 30 minutos, lavamos com PBS e colocamos o soro anti-sP21-His<sub>6</sub> em diferentes proporções (1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:500), deixamos agir por uma hora e lavamos com PBS. Como controle, executamos o mesmo procedimento utilizando soro de



animal saudável não submetido às imunizações. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpos secundários anti-*mouse* IgG conjugados com Alexa Flúor 488 verde (rnP21-His<sub>6</sub>) ou Alexa Flúor 568 vermelho (sP21-His<sub>6</sub>) por uma hora, lavamos com PBS, colocamos o agente anti-decaimento de fluorescência PPD, e obtivemos as imagens utilizando o microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M.

#### 4.9 Dot Blot

Para detectar, analisar e identificar a P21-His<sub>6</sub> nas preparações a partir dos corpos de inclusão e também fração solúvel do extrato bacteriano realizamos o Dot blot, onde inserimos preparações da sP21-His<sub>6</sub> e rnP21-His<sub>6</sub>, íntegra e desnaturada pelo calor (100°C por 5 minutos), em diferentes concentrações (4 µg, 2 µg e 1 µg) sobre uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) e deixamos secar. Bloqueamos os possíveis sítios inespecíficos, com tampão TBST com 5% de leite em pó desnatado dissolvido, durante uma hora sob agitação. Decantamos a solução de bloqueio, lavamos a membrana com tampão 1xTBST três vezes sob agitação durante oito minutos cada lavada. Diluímos o soro anti-sP21-His<sub>6</sub> no tampão TBST com 5% de leite desnatado na proporção de 1:50 e deixamos a membrana incubando com o anticorpo primário sob agitação *overnight*.

No dia seguinte lavamos a membrana três vezes com tampão TBST com 5% de leite desnatado, diluímos o anticorpo secundário peroxidase conjugada com anti-*mouse* IgG (Sigma Aldrich) no mesmo tampão na proporção de 1:1000 e deixamos a membrana incubando por uma hora. Depois lavamos a membrana com tampão 1xTBST três vezes sob agitação por oito minutos cada lavada e fizemos a reação de eletroquimioluminescência (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents).

#### 4.10 Western Blot

As proteínas rnP21-His<sub>6</sub> (2,02mg/mL) e sP21-His<sub>6</sub> (0,56mg/mL), na condição íntegra e desnaturada pelo calor a 100°C durante cinco minutos, foram aplicadas num gel de poliacrilamida/SDS a 13% para separação eletroforética. Após a eletroforese as bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) sob corrente elétrica de 100 V durante uma hora (Sistema Biorad). Após a transferência das bandas para a membrana de nitrocelulose, esta foi submetida ao mesmo tratamento dado à membrana no ensaio de Dot Blot para revelação das bandas transferidas a partir do gel.

#### 4.11 Ensaio de invasão em células não-fagocíticas

Já sabemos que a rnP21-His<sub>6</sub> é capaz de estimular a fagocitose de partículas de zymosan e aumentar a internalização de parasitas intracelulares (SILVA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012). Para verificar se sP21-His<sub>6</sub> também aumentaria a internalização de parasitas na célula hospedeira realizamos ensaios de invasão em que utilizamos células Vero como um modelo de células não-fagocíticas e parasitas *T. cruzi* da cepa CL nas formas AE e TCT, por se tratar de uma cepa pouco infectiva.

Numa placa de 24 poços contendo lamínulas circulares semeamos  $2 \times 10^5$  células Vero em DMEM10% por poço, deixamos a placa *overnight* na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para as células aderirem. No dia seguinte AE e TCT, na proporção de 20 e 10 parasitas por célula respectivamente, foram adicionados a poços para invadir estas células, na presença e na ausência de 40µg/mL de sP21-His<sub>6</sub>, por duas horas dentro da estufa.

As células foram fixadas com Bouin por 15 minutos, coradas com Giemsa por uma hora, as lamínulas foram submetidas a banhos com concentrações decrescentes de acetona (100%, 90%, 70% e 30%) e crescentes de xilol (10%, 30%, 70% e 100%), em seguida foram coladas em lâminas de vidro usando Entellan<sup>®</sup>. Com o microscópio óptico contamos a quantidade de parasitas internalizados a cada 100 células e obtivemos as imagens com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD.

#### 4.12 Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos para estudo das funções biológicas da sP21-His<sub>6</sub>

A rnP21-His<sub>6</sub> tem a capacidade de aumentar a fagocitose de partículas de zymosan. Este ensaio teve como finalidade verificar se sP21-His<sub>6</sub> também seria capaz de aumentar a fagocitose destas partículas na mesma situação. Utilizamos macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/C,  $2 \times 10^5$  células por poço foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares e deixados *overnight* para aderirem.

No dia seguinte adicionamos partículas de zymosan na proporção de 20 partículas por célula diluídos em DMEM10%, na presença ou na ausência de 40µg/mL de sP21-His<sub>6</sub>, a placa foi incubada na estufa por duas horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram fixadas com Bouin por 15 minutos, coradas com Giemsa por uma hora, as lamínulas foram submetidas a banhos com concentrações decrescentes de acetona (100%, 90%, 70% e 30%) e crescentes de xilol (10%, 30%, 70% e 100%), em seguida foram coladas em lâminas de vidro usando

Entellan<sup>®</sup>. Com o microscópio óptico contamos a quantidade de partículas internalizadas a cada 100 células e obtivemos as imagens com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD.

#### **4.13 Ensaio de fagocitose para estudo da sinalização celular ativada pela rnP21-His<sub>6</sub>**

Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 foram colhidos, contados e semeados em uma placa de 24 poços contendo lamínulas circulares, plaqueamos  $2 \times 10^5$  células por poço e deixamos em meio DMEM10% no interior de uma estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> *overnight* para que os macrófagos aderissem às lamínulas.

No dia seguinte tratamos os macrófagos com as drogas inibidoras das vias de sinalização (LY 294002, PD 98059, U0126, Rapamicina, FTA, 5-iodotubercidina, 124005) por uma a duas horas, lavamos as células três vezes com PBS para retirar os inibidores e colocamos as partículas de zymosan, na proporção de 20 partículas por célula, para serem fagocitadas por duas horas, na presença e na ausência de 40µg/mL de rnP21-His<sub>6</sub>. Durante esse tempo mantivemos a placa dentro da estufa nas condições descritas.

Ao término do tempo de fagocitose lavamos a placa três vezes com PBS, as células foram fixadas com Bouin por 15 minutos, coradas com Giemsa por uma hora, as lamínulas foram submetidas a banhos com concentrações decrescentes de acetona (100%, 90%, 70% e 30%) e crescentes de xilol (10%, 30%, 70% e 100%), em seguida foram coladas em lâminas de vidro usando Entellan<sup>®</sup>. Com o microscópio óptico contamos a quantidade de partículas de zymosan internalizadas a cada 100 células, nos poços que representavam o controle e nos tratados com cada droga inibidora das vias de sinalização individualmente, obtivemos as imagens com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD.

#### **4.14 Obtenção de soro com anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* e ensaio de imunofluorescência**

No estudo das vias de sinalização ativadas por *T. cruzi*, principalmente na etapa que utilizamos parasitas opsonizados, precisávamos de um soro com anticorpos policlonais que reconhecessem e se ligassem tanto à forma TCT quanto AE do parasita. Para obter esse soro três camundongos C57BL/6 de 20 dias de idade foram submetidos a três imunizações consecutivas com intervalos de sete dias entre cada imunização. Usamos parasitas da cepa G de *T. cruzi* nas formas TCT e AE, os quais foram contados em câmara de Neubauer e fixados

em formaldeído 4%. Após fixação retiramos o excesso de formaldeído centrifugando os parasitas a 4000rpm durante 10 minutos três vezes lavando o pellet com PBS.

Cada animal foi imunizado, por via intraperitoneal, com um volume total de 300µL contendo  $10^7$  de parasitas, usamos a proporção de 1:1 de parasitas e Adjuvante de Freud, sendo que na primeira imunização usamos Adjuvante Completo de Freud e nas duas imunizações seguintes usamos Adjuvante Incompleto de Freud. Sete dias decorridos da terceira imunização os animais foram sacrificados, o sangue foi colhido no plexo orbital e centrifugado a 2500rpm por 5 minutos para coletar o soro contendo os anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* G.

Para confirmar se o soro dos animais imunizados continha anticorpos policlonais capazes de se ligar às formas TCT e AE da cepa G de *T. cruzi* realizamos ensaios de imunofluorescência, em que colocamos formas TCT e AE ( $10^7$  parasitas) em poços distintos de uma lâmina de RIFI, deixamos à temperatura ambiente até secar. Fixamos colocando formaldeído 4% nos poços durante 30 minutos, lavamos com PBS e incubamos com o soro anti-*T. cruzi* em diferentes proporções (1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:500), deixamos agir por uma hora e lavamos com PBS. Como controle, executamos o mesmo procedimento utilizando soro de animal saudável não submetido às imunizações. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpos secundários anti-*mouse* IgG conjugados com Alexa Flúor 488 (verde) por uma hora em câmara úmida e escura, depois colocamos PPD, montamos as lâminas e obtivemos as imagens utilizando o microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M.

#### **4.15 Ensaio de invasão para estudo da sinalização celular ativada pela cepa G de *T. cruzi***

Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 foram colhidos conforme protocolo estabelecido,  $2 \times 10^5$  células por poço foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro em sub-confluência, foram deixados na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> *overnight* para aderirem. Os macrófagos foram tratados previamente com drogas inibidoras das vias de sinalização (LY294002, PD98059, U0126, Rapamicina, FTA, 5-iodotubercidina, 124005, P38) por uma a duas horas. Posteriormente os inibidores foram retirados lavando-se as células três vezes com PBS para em seguida colocarmos os parasitas para invadir por uma hora. Utilizamos formas TCT (10 parasitas/célula) e AE (20 parasitas/célula) da cepa G de *T. cruzi*, analisando separadamente a

internalização nas situações em que os parasitas estavam vivos, mortos e opsonizados. Os ensaios foram realizados de acordo com protocolos previamente estabelecidos para ambas as formas (YOSHIDA et al., 1989; FERNANDES et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Na situação em que estudamos a internalização de parasitas mortos eles foram fixados com formaldeído 4% durante uma hora, centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos para remover o formaldeído, o pellet foi ressuspendido com DMEM10%, os parasitas mortos foram contados em câmara de Neubauer e colocados para serem internalizados pelos macrófagos por uma hora. Em alguns ensaios nós também promovemos a morte dos parasitas pelo calor, submetendo-os a uma temperatura de 100°C por 15 minutos.

Nos ensaios com parasitas opsonizados, AE e TCT foram contados e incubados com soro de camundongos imunizados contra parasitas mortos da cepa G de *T. cruzi*, na proporção de 1:50 durante uma hora e colocados para invadir os macrófagos.

Posteriormente as células foram lavadas com PBS três vezes, fixadas com formaldeído 4% durante uma hora e lavadas com PBS três vezes. Procedemos a realização de reação de imunofluorescência para este estudo, marcamos a actina dos macrófagos usando Faloidina (tetramethylrhodamine isothiocyanate TRITC-Phalloidin - Sigma-Aldrich: P1951), na proporção 1:500 em PGN-saponina (PBS + gelatina-0,2% + azida e saponina-0,1%) e com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), na proporção de 1µL de DAPI para 250 µL de PGN-saponina para marcar os núcleos. Também usamos soro de animal imunizado na proporção 1:50 como anticorpo policlonal primário e Alexa Flúor 488 IgG na proporção de 1:100 como anticorpo secundário, ambos diluídos em PGN-saponina, para marcar os parasitas e assim poderemos localiza-los para contagem no interior das células. Deixamos as lamínulas em câmara úmida e escura durante uma hora. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1x e as lâminas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilenodiamina (PPD, agente “*anti-fading*”). As imagens foram adquiridas através de microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagem digital.

Em outra ocasião o mesmo experimento foi repetido utilizando coloração de Giemsa, onde as células foram fixadas com Bouin por 15 minutos, coradas com Giemsa por uma hora, as lamínulas foram submetidas a banhos com concentrações decrescentes de acetona (100%, 90%, 70% e 30%) e crescentes de xilol (10%, 30%, 70% e 100%), em seguida foram coladas em lâminas de vidro usando Entellan<sup>®</sup>. Com o microscópio óptico ou de fluorescência contamos a quantidade de parasitas internalizados a cada 100 células.

#### **4.16 Ensaio de fagocitose para estudo da sinalização celular ativada em macrófagos por partículas de zymosan**

Este ensaio teve como finalidade verificar quais as vias de transdução de sinais são ativadas em macrófagos durante o processo de fagocitose de partículas de zymosan. Também, comparar as vias ativadas em macrófagos pelas partículas de zymosan com aquelas ativadas por AE e TCT mortos.

Utilizamos macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6,  $2 \times 10^5$  células por poço foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares e deixados *overnight* para aderirem.

No dia seguinte tratamos os macrófagos com drogas inibidoras das vias de sinalização por duas horas. Após o tratamento as células foram lavadas três vezes com PBS e adicionamos as partículas de zymosan, na proporção de 20 partículas por célula, diluídos em DMEM10%, a placa foi deixada na estufa por duas horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram fixadas com Bouin por 15 minutos, coradas com Giemsa por uma hora, as lamínulas foram submetidas a banhos com concentrações decrescentes de acetona (100%, 90%, 70% e 30%) e crescentes de xilol (10%, 30%, 70% e 100%), em seguida foram coladas em lâminas de vidro usando Entellan<sup>®</sup>. Com o microscópio óptico contamos a quantidade de partículas internalizadas a cada 100 células.

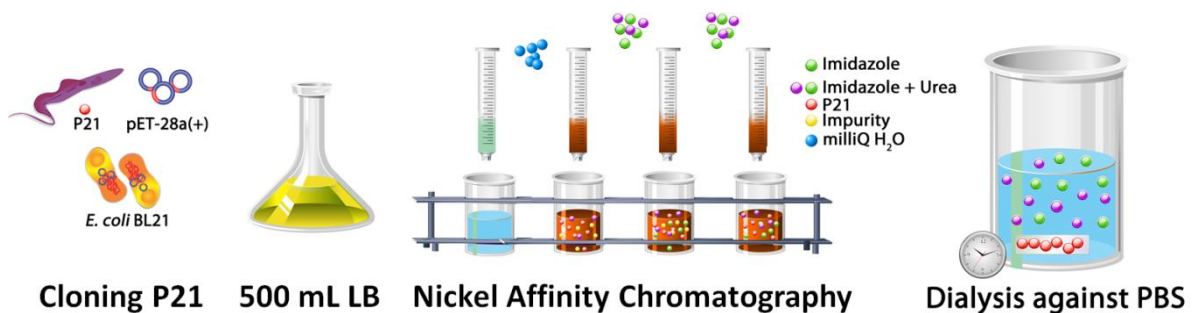
#### **4.17 Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em triplicata, três experimentos independentes cada um com três réplicas. A significância dos experimentos foi determinada pelo método ANOVA pelo GraphPad Prism (©GraphPad Software Inc, 1992-2007) versão 5.01. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$  e foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão.

## 5.0 RESULTADOS

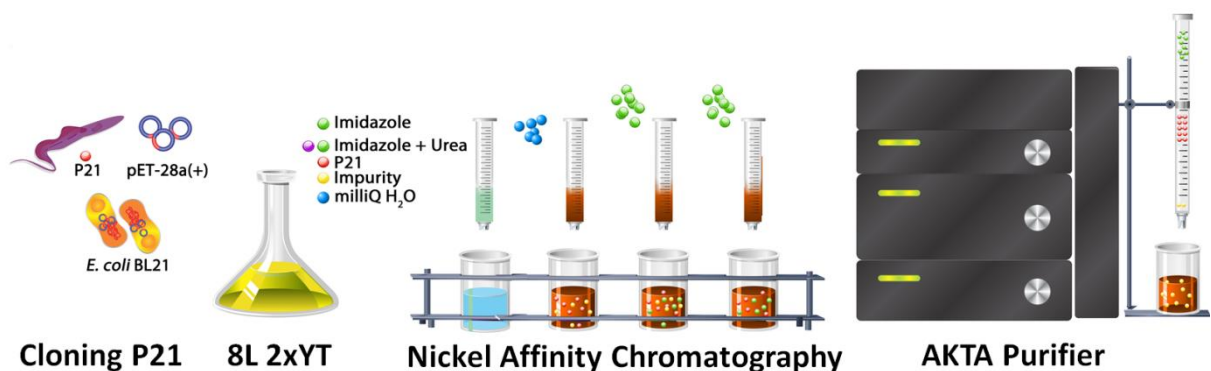
### 5.1 Purificação da P21-His<sub>6</sub>

Com o Protocolo de purificação e renovelamento da rnP21-His<sub>6</sub>, formulado por Silva et al. (2009), obtemos a proteína a partir dos corpos de inclusão do extrato bacteriano de *E. coli* em quantidades satisfatórias usando apenas 500 mL de meio LB, cromatografia de afinidade por coluna de Níquel e Diálise contra tampão PBS.



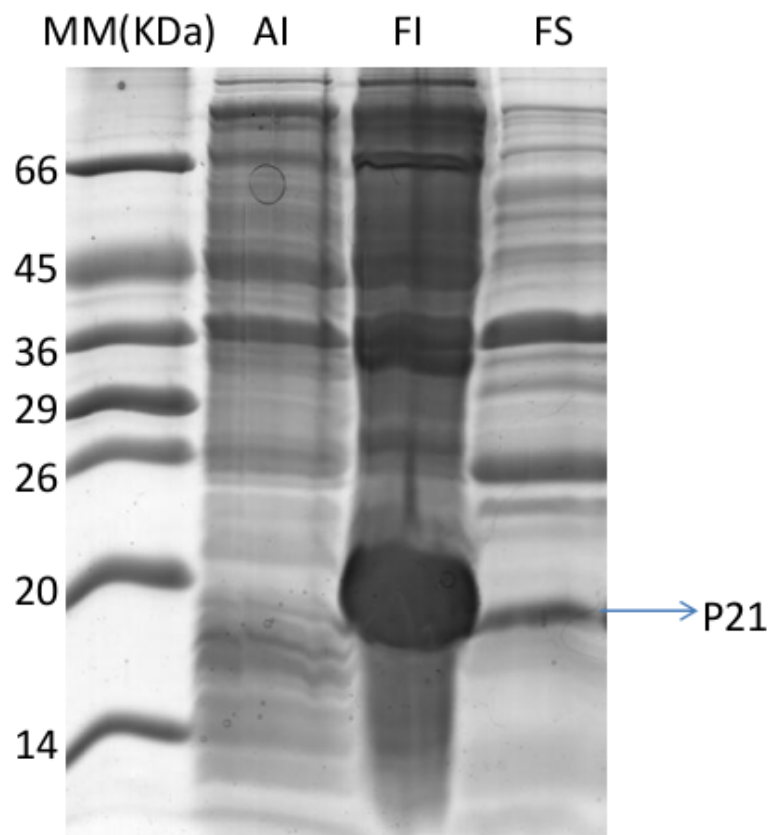
**Figura 1:** Esquema do protocolo de purificação e renovelamento da rnP21-His<sub>6</sub>.

No Protocolo de purificação da sP21-His<sub>6</sub>, elaborado pela equipe do Instituto de Física de São Carlos-SP da Universidade de São Paulo (USP), obtemos a proteína a partir da fração solúvel do extrato bacteriano, não havendo a necessidade de desnaturá-la com ureia ou executar o renovelamento, pois a proteína já está na sua configuração correta. Este método demanda mais gasto de material e requer o emprego de uma sofisticada tecnologia de purificação, fornecendo uma quantidade menor de proteína em comparação ao protocolo de renovelamento.



**Figura 2:** Esquema do protocolo de purificação da sP21-His<sub>6</sub>.

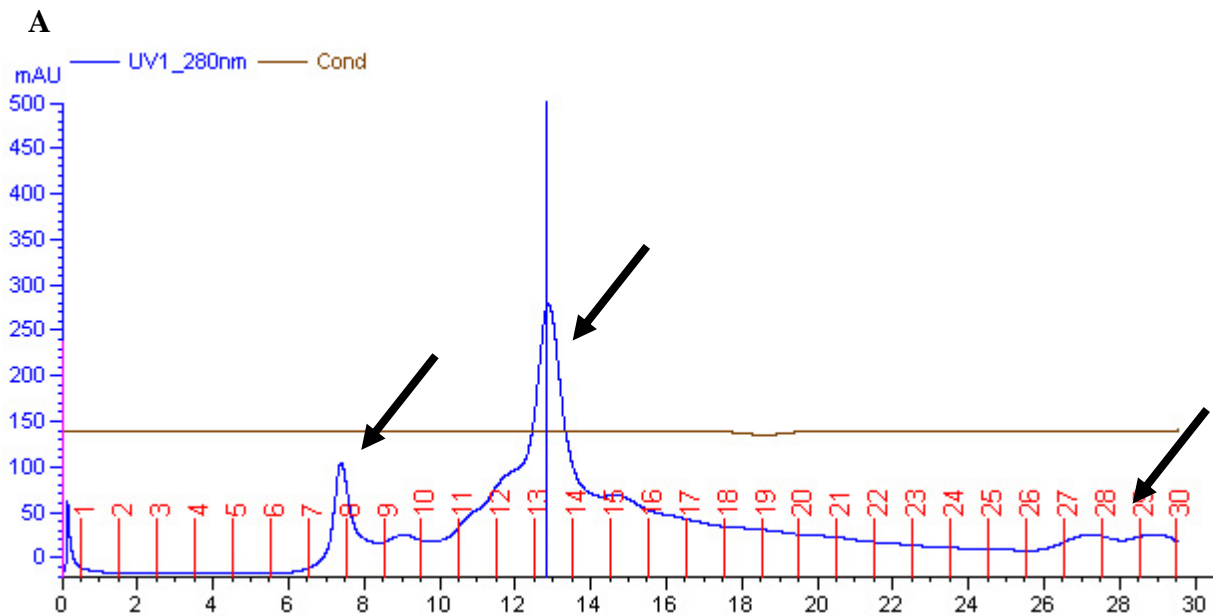
Para verificar a quantidade de P21-His<sub>6</sub> nas diferentes frações do extrato bacteriano aplicamos num gel de poliacrilamida amostras de diferentes frações do lisado bacteriano: (AI) antes da indução com o indutor de síntese proteica IPTG; (FI) fração insolúvel e (FS) fração solúvel após a indução com IPTG. Analisando o padrão das bandas que representam a proteína recombinante nas diferentes frações verificamos que a banda que representa a P21 na coluna AI é muito discreta, quase indistinguível das outras. Em contrapartida a banda da fração insolúvel (FI) é bem maior em comparação com a banda da fração solúvel (FS), indicando que a quantidade da proteína recombinante presente nos corpos de inclusão é maior naquela fração em comparação com as demais.



**Figura 3:** Gel de poliacrilamida das frações solúvel e insolúvel da P21-His<sub>6</sub>. A figura mostra as bandas que representam a P21-His<sub>6</sub> em diferentes frações do extrato bacteriano. (AI) antes da indução, (FI) fração insolúvel e (FS) fração solúvel.

Durante a purificação da sP21-His<sub>6</sub> usando o sistema AKTA o software do aparelho fornece um cromatograma que permite observarmos no gráfico os picos que representam as diferentes frações percoladas na coluna Superdex 75 10/300. Esta coluna funciona como uma peneira molecular promovendo a exclusão por tamanho, onde moléculas de tamanho maior percolam primeiro e em seguida moléculas de tamanho menor.





**Figura 4:** Perfil cromatográfico da purificação da sP21-His<sub>6</sub> usando a coluna Superdex 75 10/300 GE Healthcare/Amersham Biosciences. A leitura foi realizada pelo Sistema AKTA Purifier a 280nm. Nas figuras A e B as setas apontam, da esquerda para direita, o primeiro pico (6 a 8mL) que representa as impurezas, o segundo pico (12, 13 e 14 mL) que representa a sP21-His<sub>6</sub> purificada e o último pico é o Imidazol. A unidade mAU significa miliunidades de absorbância.

Para comparar o rendimento obtido por cada protocolo de purificação em fornecer a proteína recombinante em quantidades satisfatórias montamos uma tabela com dados de purificação e concentrações da proteína obtida utilizando cada um dos protocolos

**Tabela 2 – Rendimento da P21-His<sub>6</sub> obtida por protocolo de purificação**

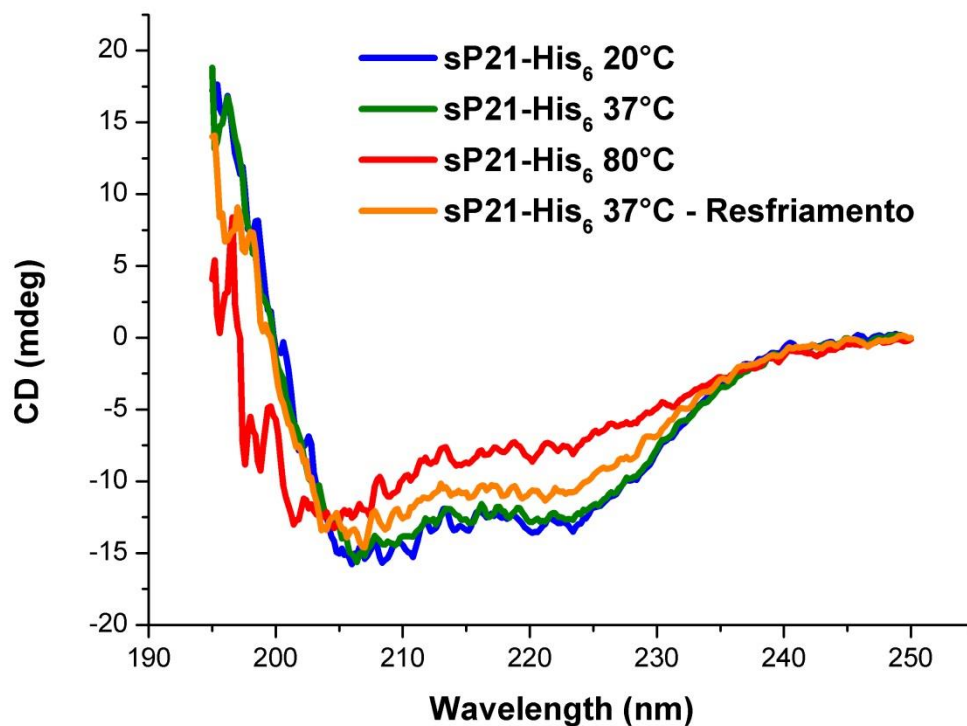
Método de purificação	Meio de Cultura	Quantidade de meio	Temperatura	IPTG 1M	Concentração da P21-His <sub>6</sub> (mg/mL)
1º Renovamento	LB	0,5L	37°C	0,5mM	1,40mg/mL
2º Renovamento	LB	0,5L	37°C	0,5mM	2,02mg/mL
3º Renovamento	LB	0,5L	37°C	0,5mM	1,00mg/mL
4º Renovamento	LB	0,5L	37°C	0,5mM	0,73mg/mL
5º Renovamento	LB	0,5L	37°C	0,5mM	0,87mg/mL
1º Solúvel	2xYT	6-8L	37°C	0,5mM	0,50mg/mL
2º Solúvel	2xYT	6-8L	37°C	0,5mM	0,70mg/mL
3º Solúvel	2xYT	6-8L	37°C	0,5mM	0,60mg/mL
4º Solúvel	2xYT	6-8L	37°C	0,5mM	0,32mg/mL
5º Solúvel	2xYT	6-8L	37°C	0,5mM	0,56mg/mL

Fonte: Laboratório de Tripanosomatídeos-UFU/InFis-USP

A tabela mostra os dados provenientes de dez purificações diferentes, sendo que cinco purificações foram realizadas com um protocolo e cinco com outro. Percebemos que as purificações a partir dos corpos de inclusão do extrato bacteriano fornecem maiores quantidades da proteína utilizando uma quantidade menor de meio de crescimento de bactérias, em comparação à fração solúvel do mesmo extrato.

## 5.2 Espectropolarimetria de dicroísmo circular da P21-His<sub>6</sub>

Para estudar o renovelamento da P21-His<sub>6</sub> e a capacidade de recuperar sua estrutura secundária quando submetida a aumentos de temperatura e posteriormente resfriamento analisamos a proteína utilizando Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular.

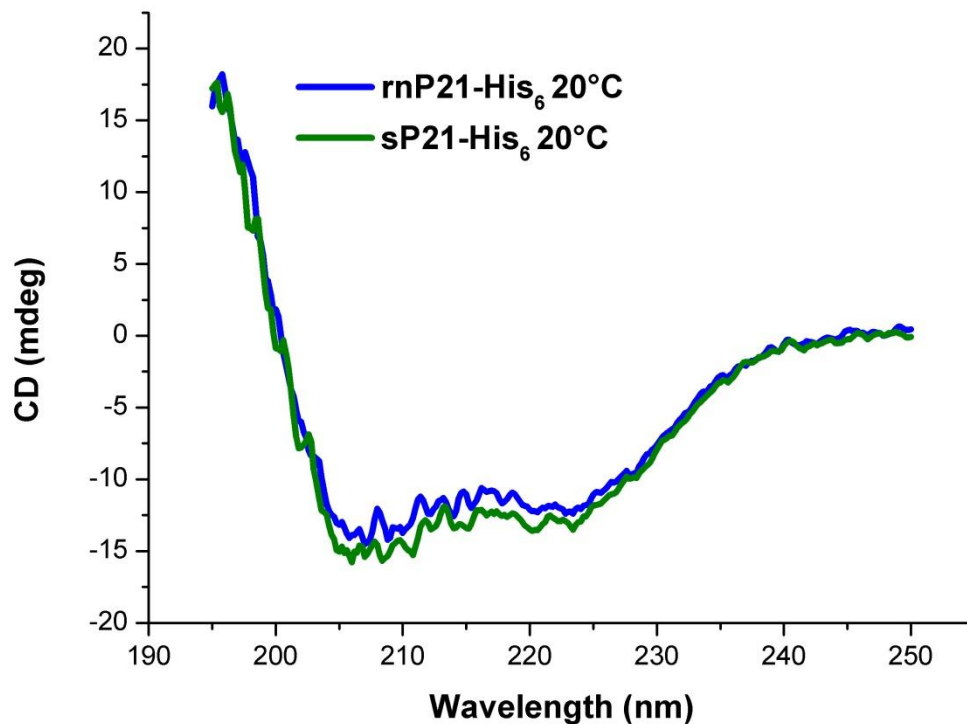


**Figura 5:** Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular da sP21-His<sub>6</sub>. A proteína foi submetida a variações de temperatura desde 20°C até 80°C e posteriormente resfriada até 37°C tendo em vista avaliar sua capacidade de recuperação da estrutura secundária.

O gráfico mostra que os espectros que correspondem às temperaturas de 20°C e 37°C (azul e verde respectivamente) estão intimamente próximos indicando que a estrutura secundária da proteína não sofreu modificações nestas temperaturas. Porém, temperaturas acima de 37°C provocaram alterações na estrutura tridimensional da sP21-His<sub>6</sub>, de modo que

a 80°C (espectro vermelho) o perfil do espectro se distancia claramente dos demais sugerindo que houve uma brusca mudança na conformação da proteína. Entretanto, após o resfriamento até a temperatura de 37°C (espectro amarelo) houve uma aproximação ao estado inicial, isso indica que uma fração de toda sP21-His<sub>6</sub> presente na amostra recupera sua estrutura secundária.

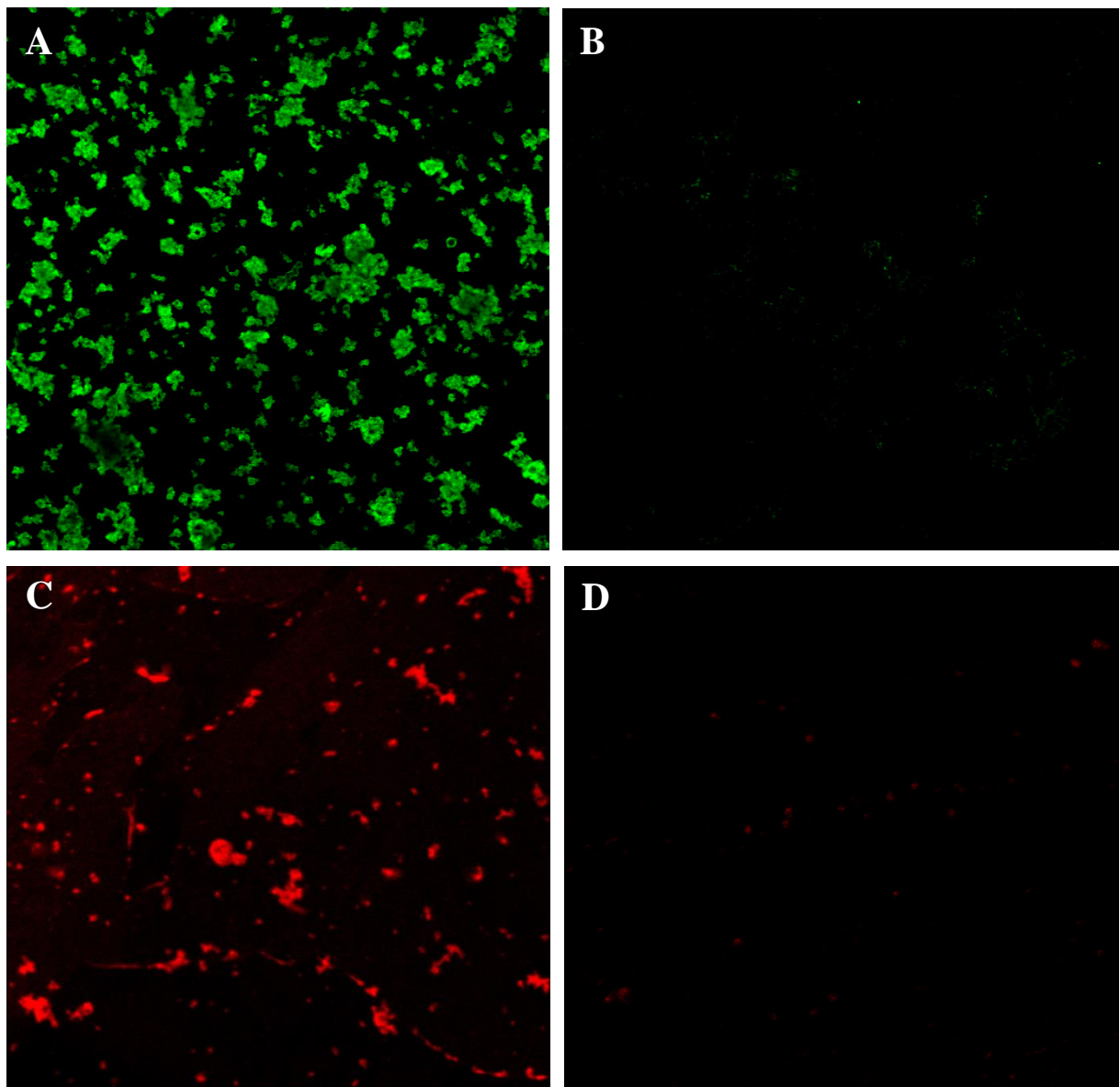
Ainda, utilizando o dicroísmo circular comparamos os espectros obtidos com a proteína recombinante renovada (espectro azul) com o espectro da proteína solúvel (espectro verde) a 20°C. A partir das análises realizadas por Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular percebemos que as proteínas purificadas a partir de cada protocolo, embora obtidas de frações distintas do extrato bacteriano, possuem a mesma estrutura secundária. Além disso, outros experimentos foram realizados para verificarmos se a sP21-His<sub>6</sub> possui as mesmas funções biológicas já observadas na rnP21-His<sub>6</sub>.



**Figura 6:** Comparação entre a rnP21-His<sub>6</sub> e a sP21-His<sub>6</sub> por Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular. As amostras purificadas a partir dos corpos de inclusão e fração solúvel do extrato bacteriano respectivamente foram analisadas por Dicroísmo Circular a 20°C e seus espectros comparados a fim de verificar se possuem a mesma estrutura secundária.

### 5.3 Ensaio de imunofluorescência da P21-His<sub>6</sub>

Utilizando soro de camundongos imunizados contra sP21-His<sub>6</sub> fizemos ensaios de imunofluorescência para verificar se os anticorpos policlonais presentes no soro seriam capazes de reconhecer e se ligar tanto à sP21-His<sub>6</sub> quanto à rnP21-His<sub>6</sub>, quando comparado com o soro de animal saudável não imunizado.

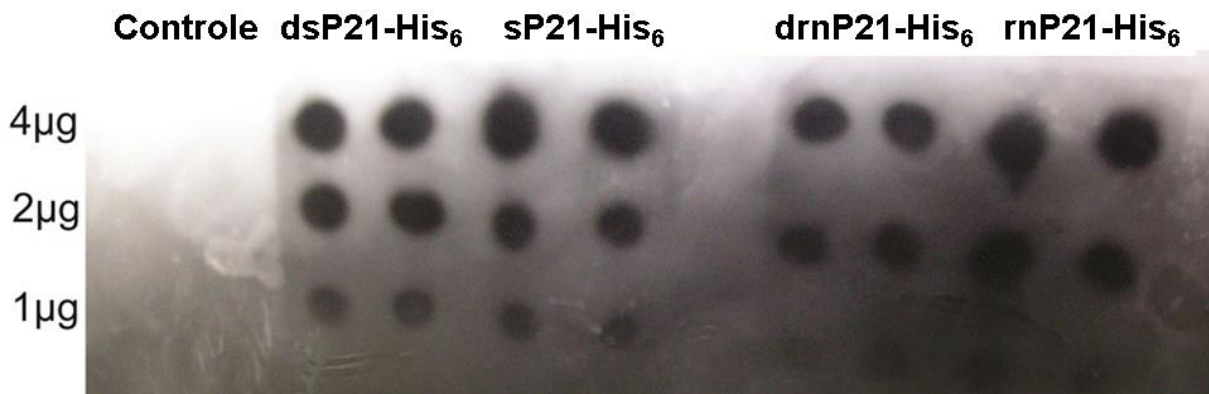


**Figura 7:** Ensaio de Imunofluorescência da rnP21-His<sub>6</sub> e sP21-His<sub>6</sub>. (A) rnP21-His<sub>6</sub> incubada com soro de animais imunizados contra sP21-His<sub>6</sub> e marcada com IgG Alexa Flúor 488 (verde), (B) controle com rnP21-His<sub>6</sub> incubada com soro de animais saudáveis não imunizados; (C) sP21-His<sub>6</sub> e incubada com soro de animais imunizados contra sP21-His<sub>6</sub> e marcada com IgG Alexa Flúor 568 (vermelho), (D) controle com sP21-His<sub>6</sub> incubada com soro de animais saudáveis não imunizados. Microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagem digital.

Nas imagens podemos observar que apesar dos anticorpos policlonais terem sido produzidos em animais imunizados contra sP21-His<sub>6</sub>, eles também foram capazes de reconhecer e se ligar à rnP21-His<sub>6</sub>. Dessa forma, somente as lâminas incubadas com o soro dos animais imunizados contra a proteína recombinante exibiram a marcação do fluoróforo.

#### 5.4 Dot Blot

Realizamos o Dot Blot em que aplicamos concentrações decrescentes de sP21-His<sub>6</sub> e rnP21-His<sub>6</sub> (íntegras e desnaturadas pelo calor) em duas membranas de nitrocelulose, uma delas incubamos com o soro de camundongos imunizados contra sP21-His<sub>6</sub> contendo anticorpos policlonais, a outra foi incubada com soro de animais saudáveis não-imunizados.

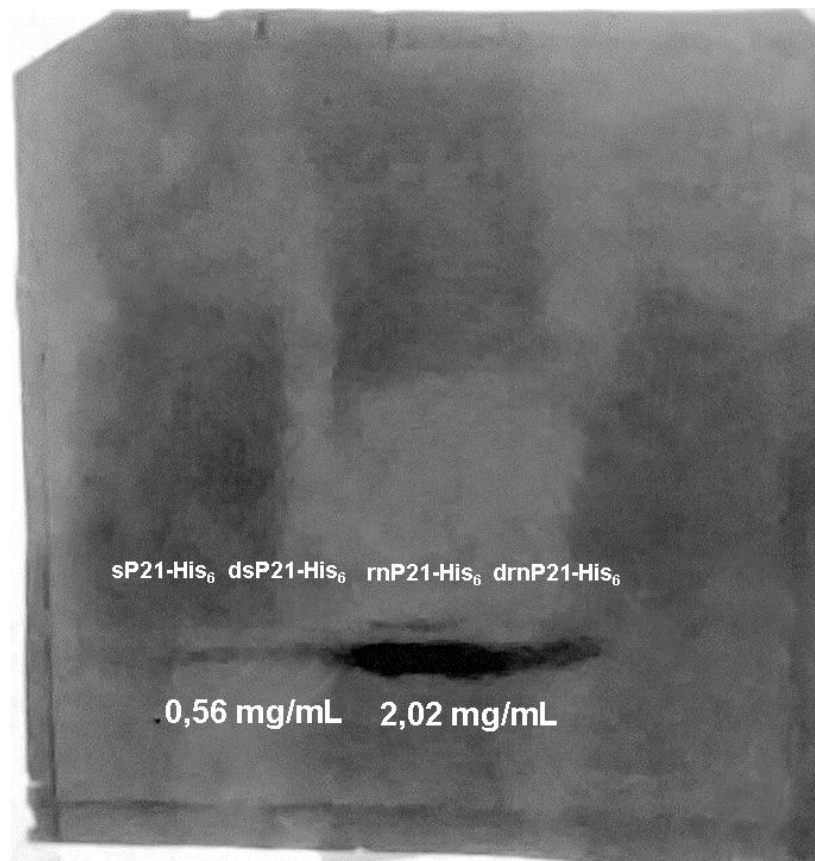


**Figura 8:** Dot Blot comparando a rnP21-His<sub>6</sub> e sP21-His<sub>6</sub> íntegras e desnaturadas pelo calor. O soro de animais imunizados contra a sP21-His<sub>6</sub> continha anticorpos policlonais capazes de reconhecerem e se ligarem à rnP21-His<sub>6</sub> e também à sP21-His<sub>6</sub> nas suas formas íntegras e desnaturadas pelo calor (dsP21-His<sub>6</sub> e drnP21-His<sub>6</sub>) a 100°C por 5 minutos.

Após a reação de eletroquimioluminescência observamos que somente a membrana incubada com soro de animais imunizados contra a proteína recombinante os anticorpos foram capazes de reconhecer e se ligar às duas proteínas, não só nas situações em que elas estavam íntegras, mas também quando foram desnaturadas pelo calor, os anticorpos policlonais anti-sP21-His<sub>6</sub> reconhecem as proteínas nas duas condições, íntegras e desnaturadas pelo calor, em relação ao controle tratado com soro de animais saudáveis não imunizados.

## 5.5 Western Blot

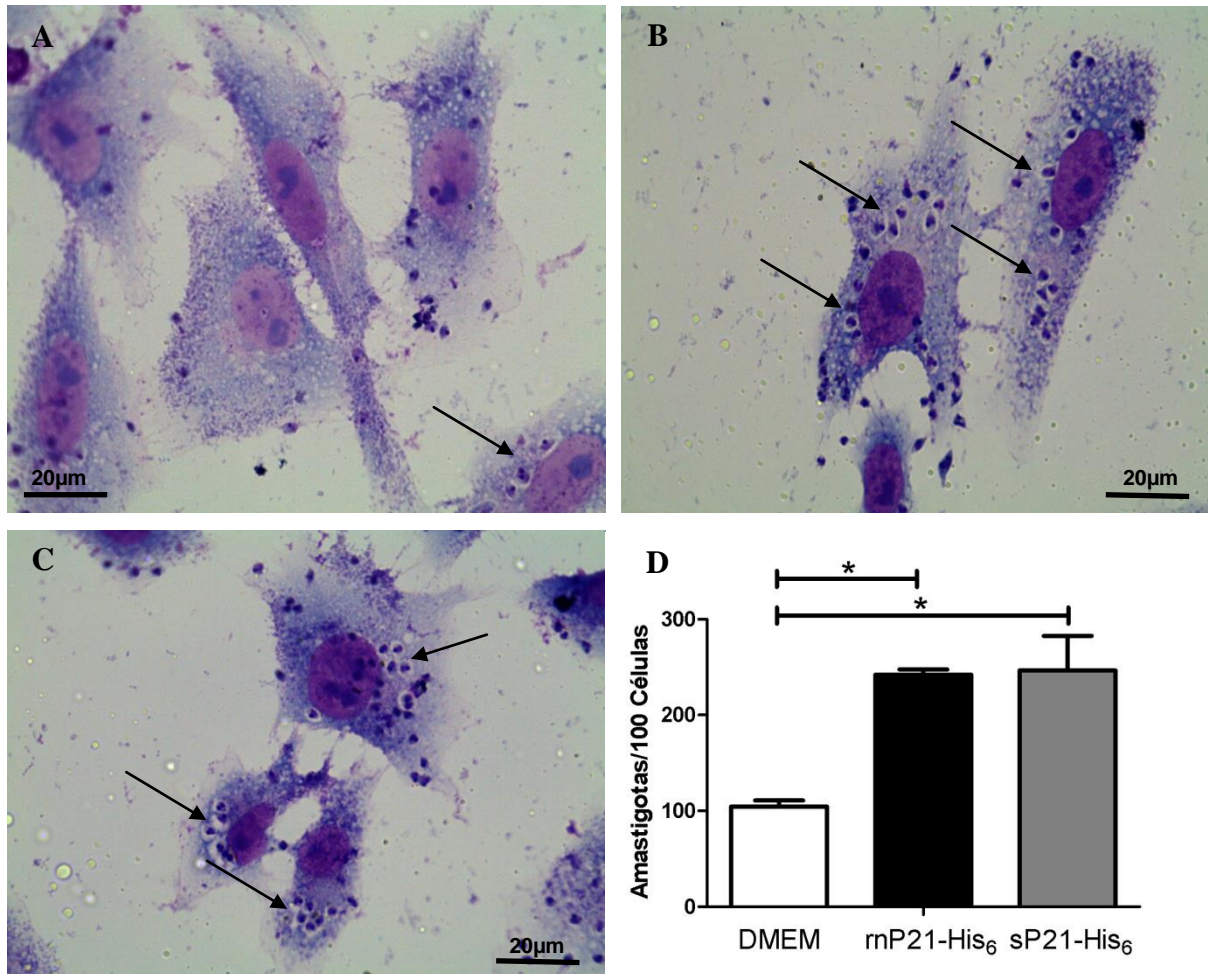
Tal como aconteceu no ensaio de Dot blot, por Western Blot também verificamos que os anticorpos policlonais provenientes do soro de animais imunizados contra sP21-His<sub>6</sub> reconheceram ambas as proteínas, na forma íntegra e na forma desnaturada pelo calor.



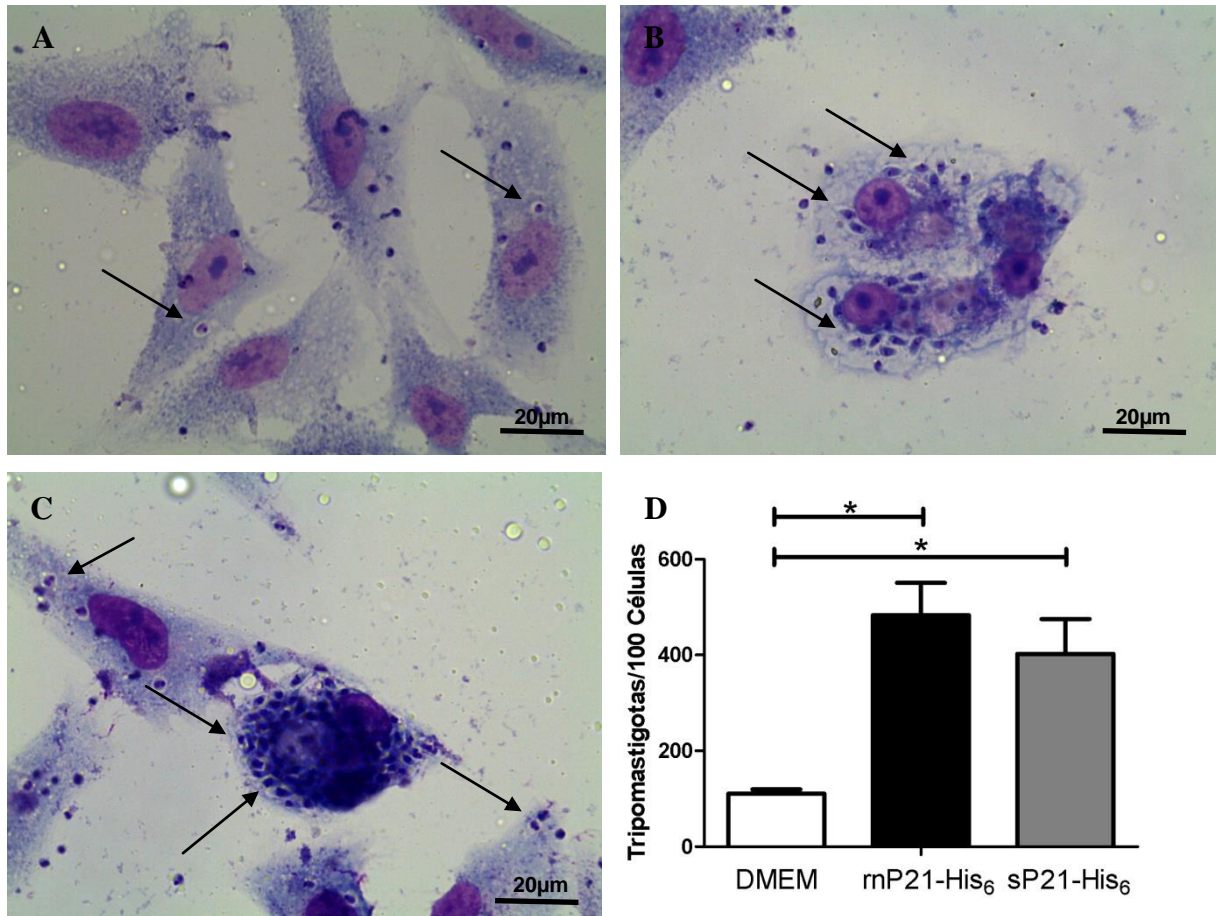
**Figura 9:** Western Blotting em membrana de nitrocelulose evidenciando a rnP21-His<sub>6</sub> e sP21-His<sub>6</sub> na forma íntegra e desnaturada (d). A rnP21-His<sub>6</sub> apresenta uma marcação mais escura devido à concentração da solução estoque ser maior que a da sP21-His<sub>6</sub>.

## 5.6 Ensaio de invasão de células não-fagocíticas

Segundo Silva et al. (2009) a rnP21-His<sub>6</sub> é capaz de aumentar a invasão celular por formas AE e TCT de *T. cruzi*. Para avaliar se a sP21-His<sub>6</sub> também possui esta mesma capacidade de aumentar a internalização dos parasitas realizamos ensaios de invasão de células não-fagocíticas, neste caso usamos células Vero, *T. cruzi* da cepa CL nas formas AE e TCT, tratadas ou não com 40µg/mL da proteína.



**Figura 10:** Ensaio de Invasão de células não-fagocíticas por AE de *T. cruzi*. Células Vero tratadas ou não com 40 μg/mL de rnP21-His<sub>6</sub> ou sP21-His<sub>6</sub> incubadas com AE de *T. cruzi*, (A) Controle não tratado, (B) células Vero tratadas com rnP21-His<sub>6</sub>, (C) células Vero tratadas com sP21-His<sub>6</sub>. As setas indicam os AE internalizados, possuem um halo claro ao seu redor. Imagens obtidas com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD aumento de 100x. (D) Resultados do ensaio de invasão de células não-fagocíticas, o tratamento com a rnP21-His<sub>6</sub> ou sP21-His<sub>6</sub> induziu o aumento da invasão das formas AE (20 parasitas/célula) de *T. cruzi* em células Vero (\* P ≤ 0,05). Análise estatística: One-way ANOVA, “Post test” Bonferroni.

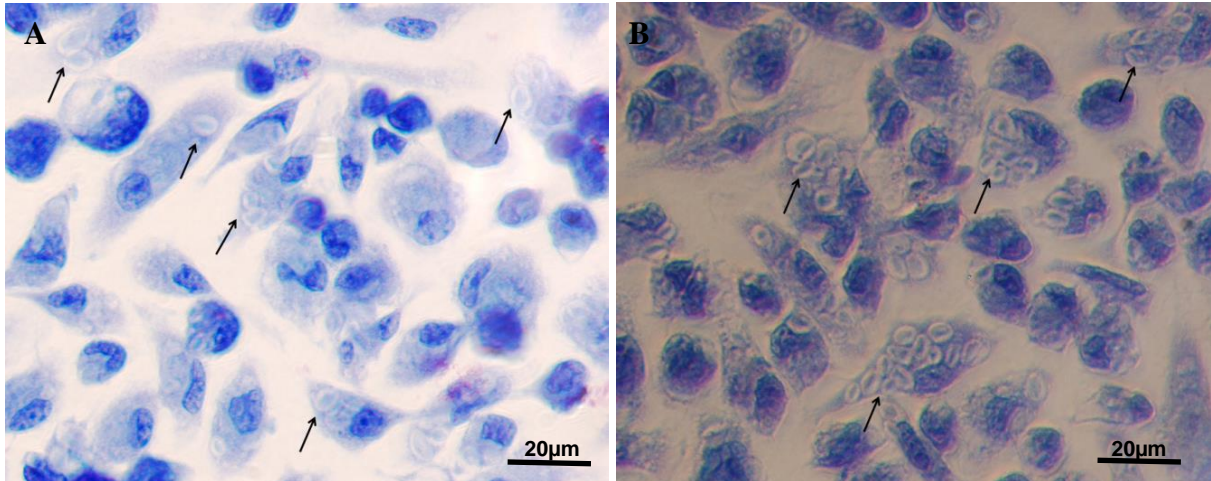


**Figura 11:** Ensaio de Invasão de células não-fagocíticas por TCT de *T. cruzi*. Células Vero foram tratadas ou não com 40 μg/mL de rnP21-His<sub>6</sub> ou sP21-His<sub>6</sub> e incubadas com TCT de *T. cruzi*. (A) Controle não tratado, (B) células Vero tratadas com rnP21-His<sub>6</sub>, (C) células Vero tratadas com sP21-His<sub>6</sub>. As setas indicam os TCT internalizados, possuem um halo claro ao seu redor. Imagens obtidas com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD aumento de 100x. (D) Resultados do ensaio de invasão de células não-fagocíticas, o tratamento com a rnP21-His<sub>6</sub> ou sP21-His<sub>6</sub> induziu o aumento da invasão das formas TCT (10 parasitas/célula) de *T. cruzi* em células Vero (\* P<0,05). Análise estatística: One-way ANOVA, “Post test” Bonferroni.

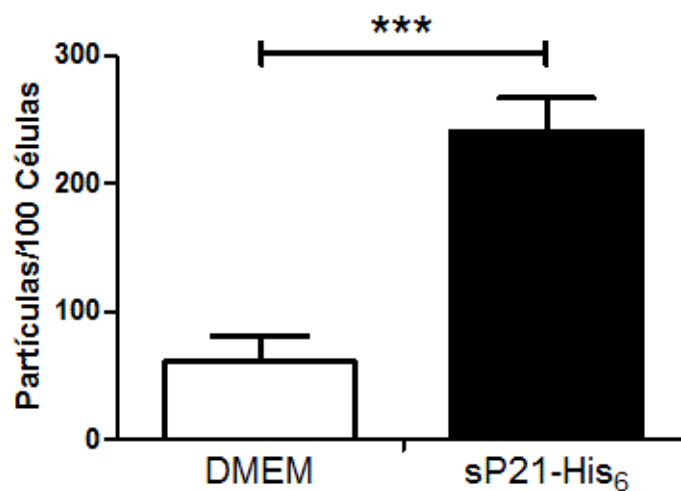
### 5.7 Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan para estudo das funções biológicas da sP21-His<sub>6</sub>

Conforme Rodrigues et al. (2012) a rnP21-His<sub>6</sub> é capaz estimular macrófagos inflamatórios peritoneais de camundongos C57BL/6 a aumentarem a fagocitose de partículas de zymosan. Neste ensaio buscamos verificar se a sP21-His<sub>6</sub> também seria capaz de induzir este mesmo evento.





**Figura 12:** Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan. Macrófagos inflamatórios peritoneais de camundongos BALB/C tratados (B) ou não tratados (A) com 40µg/mL de sP21-His<sub>6</sub>. As setas indicam as partículas de zymosan (20 partículas/célula) fagocitadas. Imagens obtidas com o microscópio óptico de captura de imagem LEICA ICC50 HD aumento de 100x.



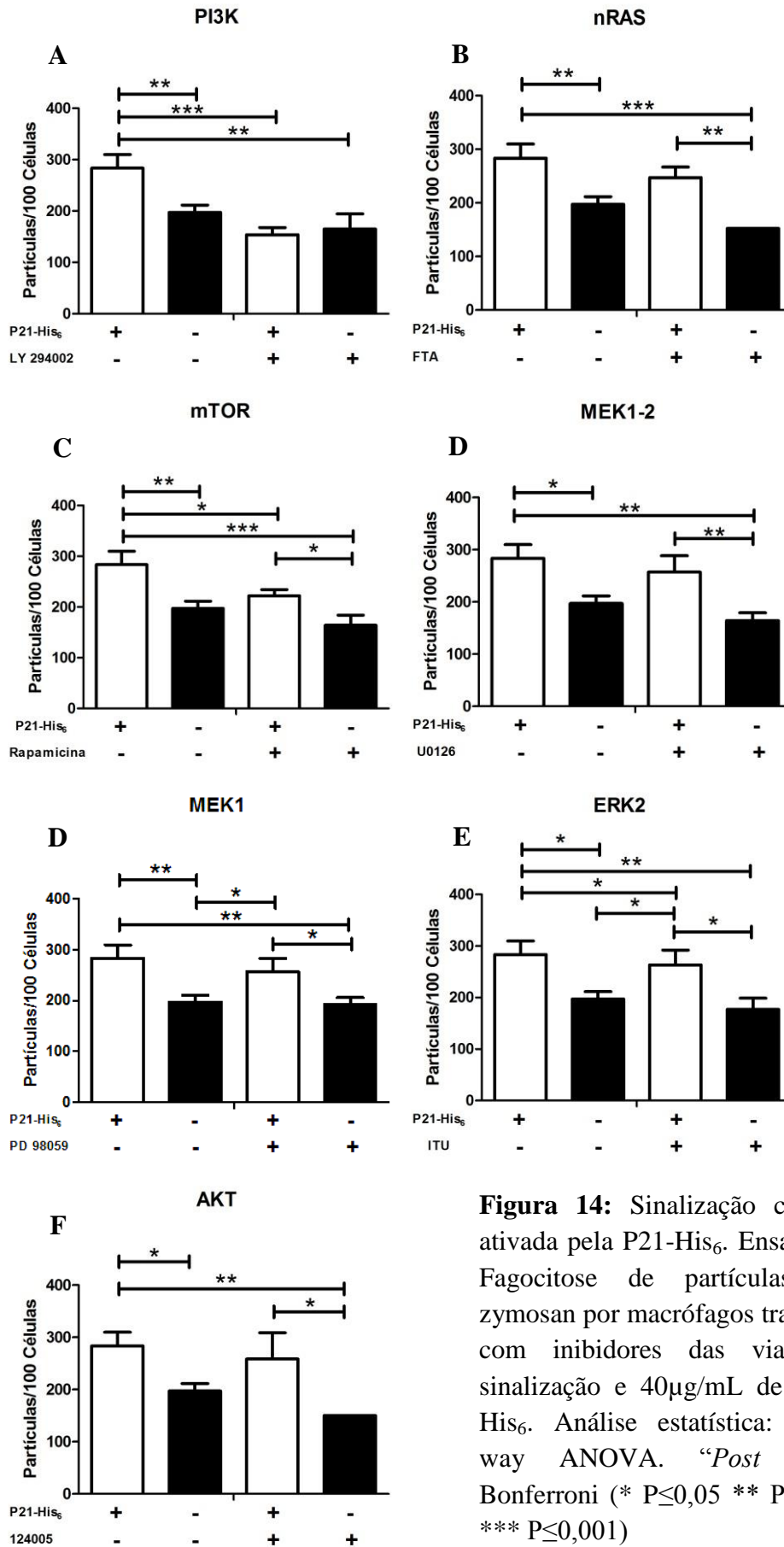
**Figura 13:** Resultado do ensaio de fagocitose de partículas de zymosan. O tratamento com sP21-His<sub>6</sub> foi capaz de aumentar de forma intensa o processo fagocítico das partículas de zymosan por macrófagos (\*\*\*)  $P \leq 0,001$ ). Análise estatística: One-way ANOVA. “Post test” Bonferroni.

Contamos o número de partículas internalizadas a cada 100 células, este ensaio deixou bem evidente que a sP21-His<sub>6</sub> tem a mesma capacidade de estimular o processo de fagocitose já comprovado com outros experimentos realizados com a rnP21-His<sub>6</sub>.

## **5.8 Ensaio de fagocitose para estudo da sinalização celular ativada pela P21-His<sub>6</sub>**

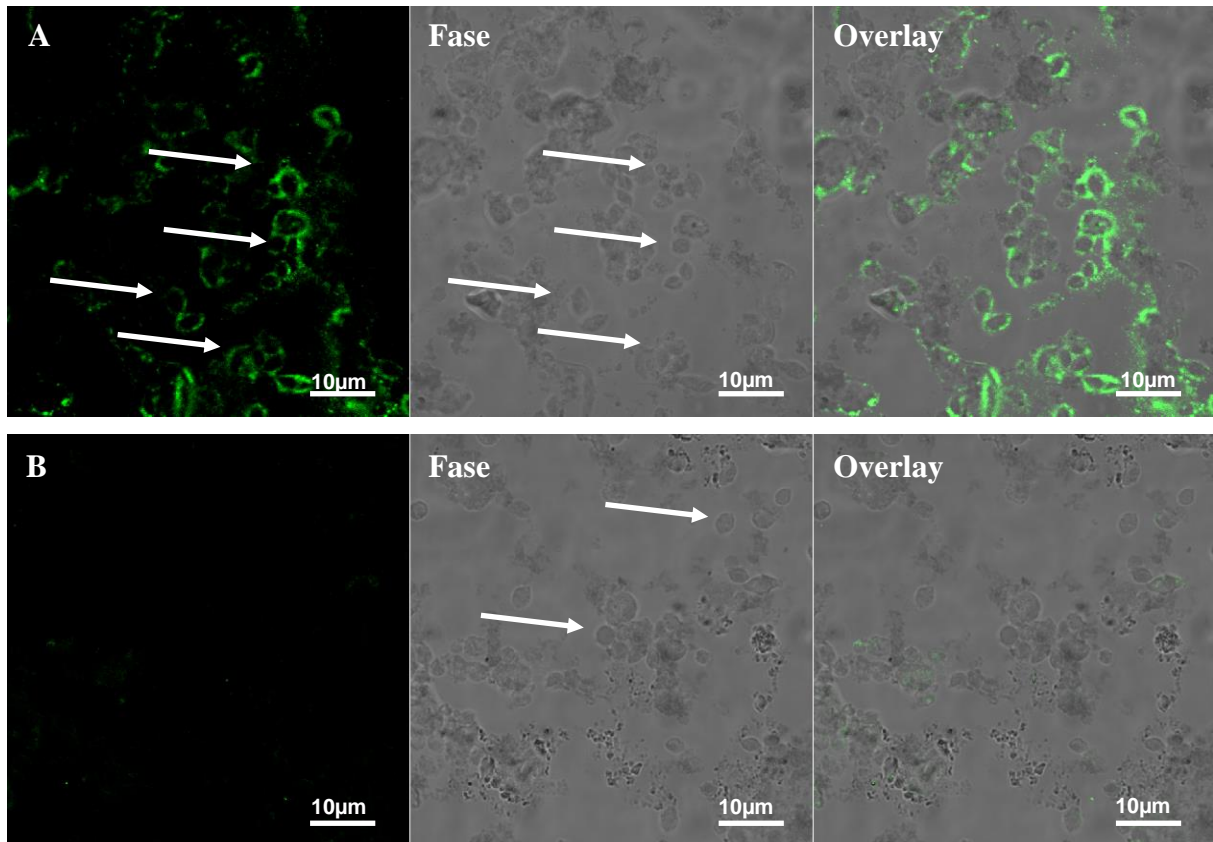
Sabemos que a rnP21-His<sub>6</sub> e a sP21-His<sub>6</sub> possuem a mesma estrutura secundária, são capazes de aumentar a internalização de parasitas nas células e também estimulam os macrófagos a aumentarem o processo de fagocitose de partículas de zymosan. Mas para entender mais profundamente o modo como a proteína atua nas células realizamos ensaios de fagocitose por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6, tratados ou não com 40µg/mL de rnP21-His<sub>6</sub> e drogas inibidores das vias de sinalização celular para descobrir quais vias são na verdade ativadas pela proteína durante sua atuação nas células.

As drogas inibidoras das vias de sinalização utilizadas e as respectivas concentrações de uso foram: 50µM do inibidor de PI3 quinase LY294002, 50µM inibidor de nRas FTA, 10nM do inibidor de mTOR Rapamicina, 10µM do inibidor de MEK1/2 U0126, 50µM do inibidor de MEK1 PD98059, 20µM do inibidor de ERK2 a 5-Iodotubercidina (ITU) e 25µM do inibidor de AKT 124005.



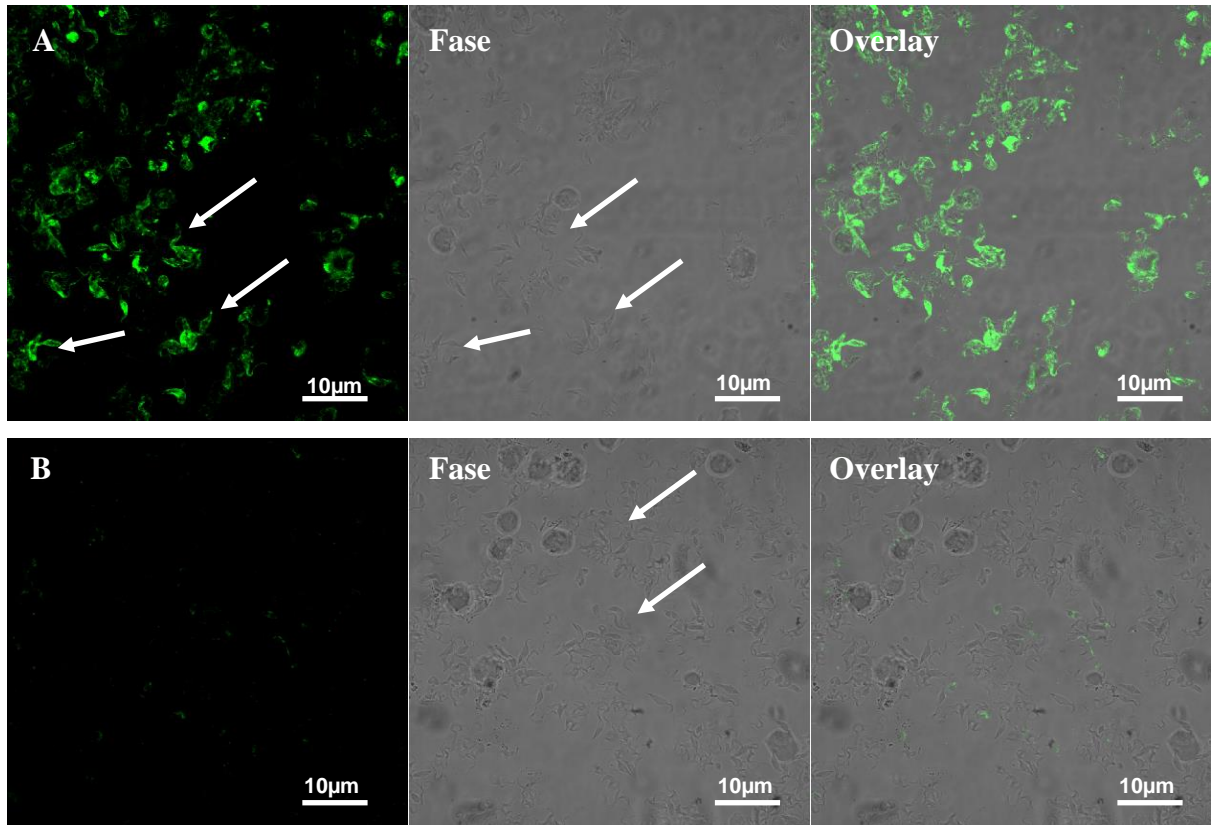
**Figura 14:** Sinalização celular ativada pela P21-His<sub>6</sub>. Ensaio de Fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização e 40µg/mL de P21-His<sub>6</sub>. Análise estatística: One-way ANOVA. “Post test” Bonferroni (\* P≤0,05 \*\* P≤0,01 \*\*\* P≤0,001)

### 5.9 Ensaio de imunofluorescência: teste do soro contendo anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* cepa G



**Figura 15:** Ensaio de imunofluorescência com AE de *T. cruzi* da cepa G. Em (A) AE foram incubados com soro de camundongos imunizados contra a cepa G de *T. cruzi* e marcados com IgG Alexa Flúor 488 (verde/seta). Em (B) controle com AE incubados com soro de animais saudáveis não imunizados, os parasitas não exibiram a marcação em verde do fluoróforo. As setas apontam para os AE. Imagens adquiridas com o microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagem digital.

Na figura 16 podemos ver que o soro dos animais imunizados possuem anticorpos policlonais capazes de reconhecer e se ligar aos AE, quando comparado ao soro de animais saudáveis não imunizados que não demonstrou nenhuma marcação específica.

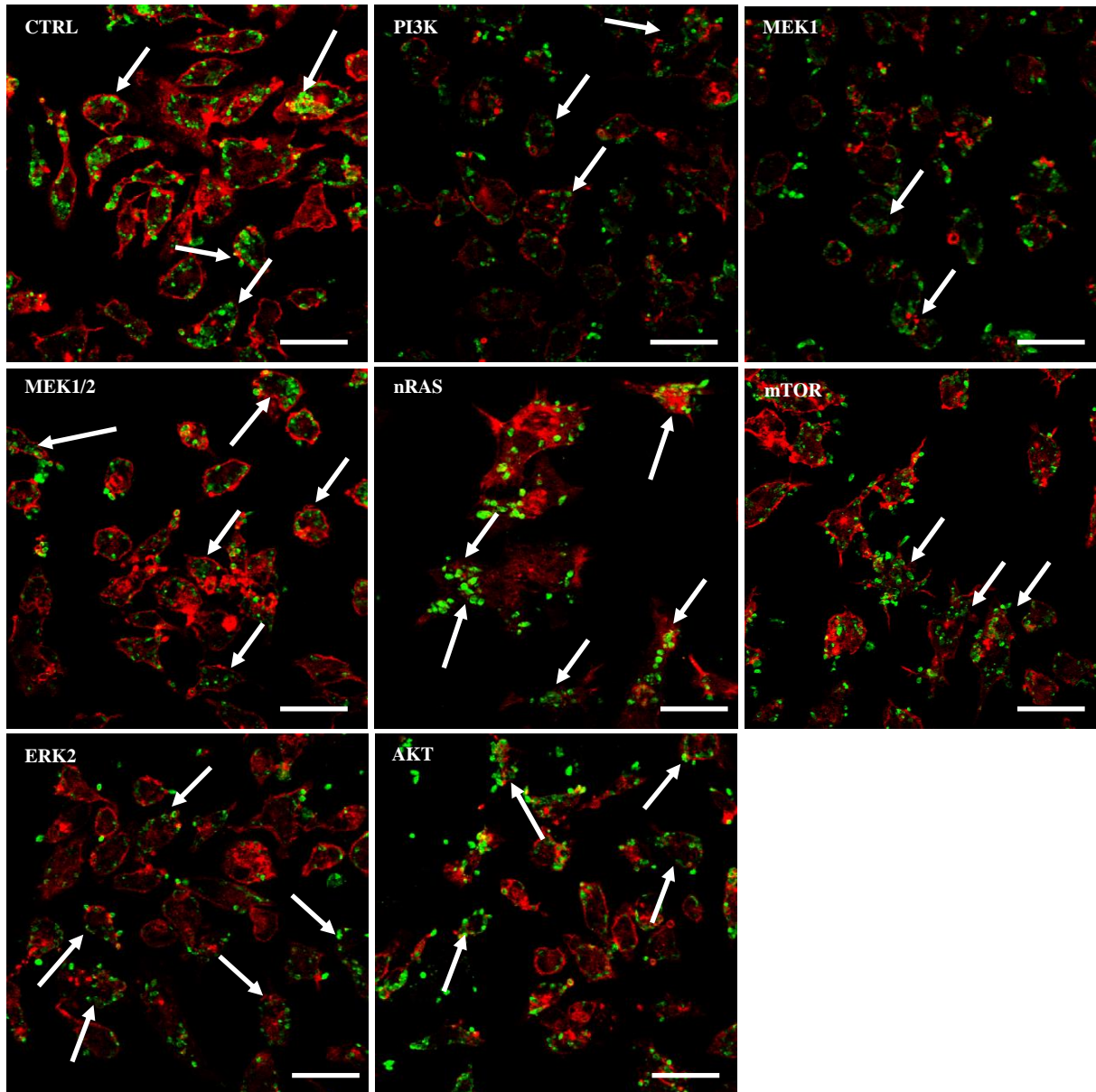


**Figura 16:** Ensaio de imunofluorescência com TCT de *T. cruzi* cepa G. Em (A) TCT foram incubados com soro de camundongos imunizados contra a cepa G de *T. cruzi* e marcados com IgG Alexa Flúor 488 (verde). Em (B) controle com TCT incubados com soro de animais saudáveis não imunizados, os parasitas não exibiram a marcação em verde do fluoróforo. As setas apontam para os TCT. Imagens adquiridas com o microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M, acoplado com sistema de aquisição de imagem digital.

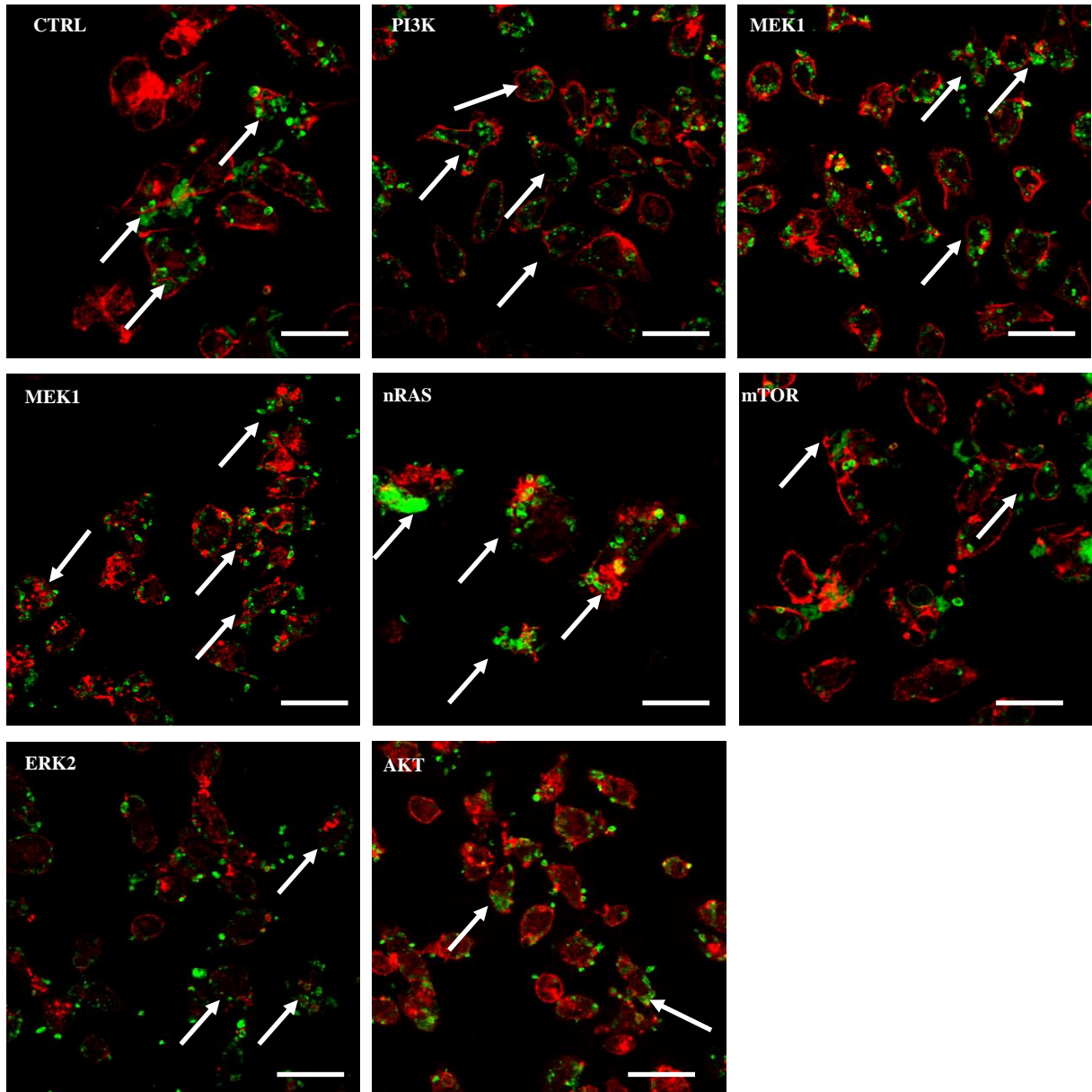
Em relação aos TCT de *T. cruzi*, tal como foi possível ver na figura 17, os anticorpos policlonais do soro dos animais imunizados também reconheceram e se ligaram a esta forma do parasita quando comparamos com o soro de animais saudáveis não imunizados.

#### 5.10 Ensaio de invasão para estudo da sinalização celular ativada pela cepa G de *T. cruzi*

Neste ensaio AE e TCT foram opsonizados durante uma hora sob agitação, usamos o soro de camundongos imunizados contra parasitas da cepa G de *T. cruzi* contendo anticorpos policlonais, os parasitas foram marcados com anti-mouse IgG Alexa Flúor 488 (verde), os macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 tiveram seu citoesqueleto de actina marcado com Faloidina-TRITC (Sigma), vermelho.



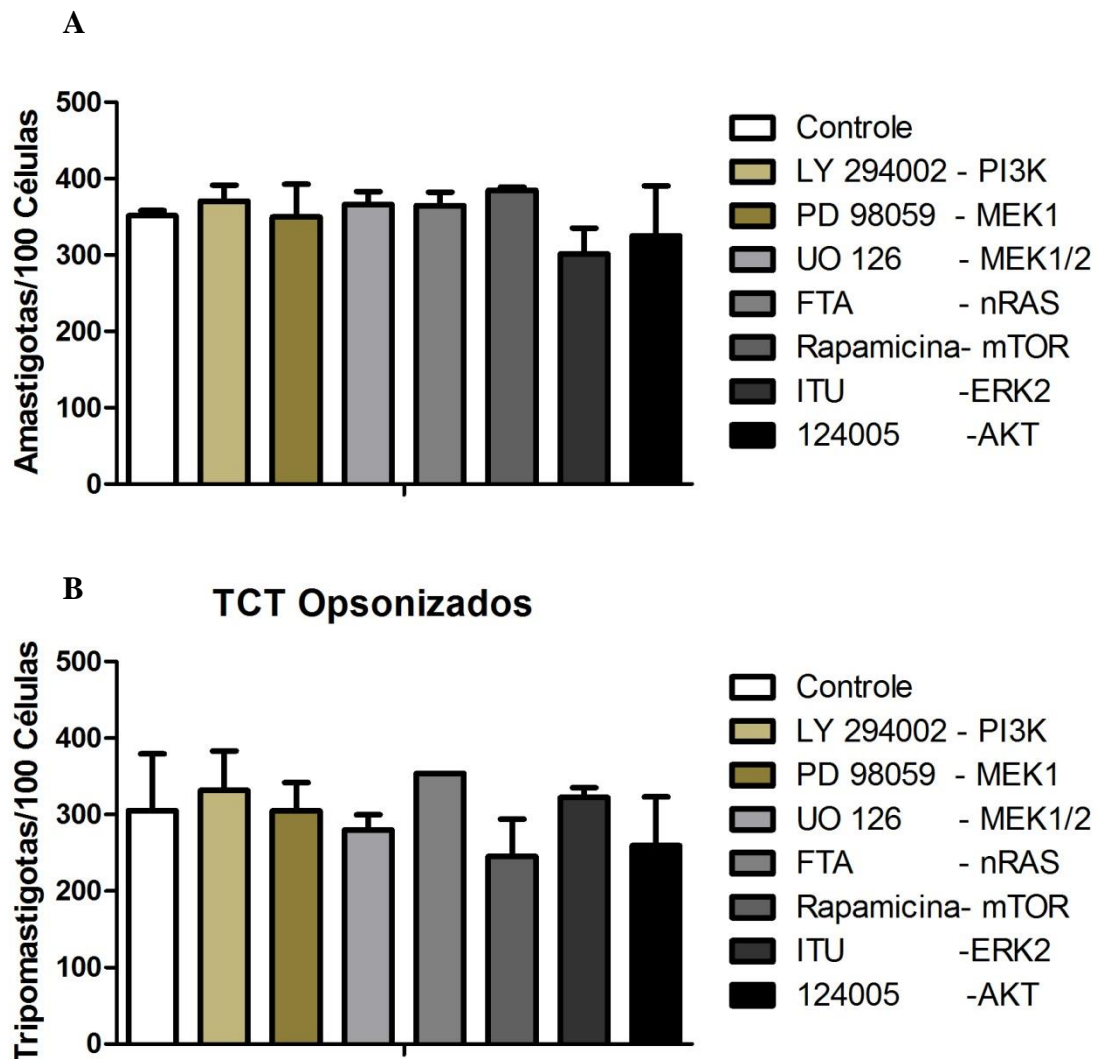
**Figura 17:** Ensaio de imunofluorescência com macrófagos tratados com drogas inibidoras das vias de sinalização e AE opsonizados. As setas brancas indicam os parasitas opsonizados com soro de animais imunizados contra *T. cruzi* cepa G e marcados com IgG Alexa Flúor 488 (verde). A actina dos macrófagos foi marcada com Faloidina-TRITC (vermelho). Imagens obtidas com o microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M. Barras 20 $\mu$ m.



**Figura 18:** Ensaio de imunofluorescência com macrófagos tratados com drogas inibidoras das vias de sinalização e TCT opsonizados. As setas brancas indicam os parasitas opsonizados com soro de animais imunizados contra *T. cruzi* cepa G e marcados com IgG Alexa Fluóor 488 (verde). A actina dos macrófagos foi marcada com Faloidina-TRITC (vermelho). Imagens obtidas com o microscópio confocal (Zeiss, LSM 510 Meta, Germany), Zeiss Axiovert 200M. Barras 20 $\mu$ m.

Contabilizamos o número de parasitas internalizados a cada 100 células utilizando o Microscópio de fluorescência, pelas imagens percebemos que a quantidade de parasitas que invadiram foi muito grande. Sugerindo que o processo de opsonização dos parasitas aumentou a captação dos mesmos pelos macrófagos. Os resultados obtidos estão representados na Figura 20, onde verificamos que o tratamento com as drogas inibidoras não mostrou resultados muito diferentes do controle não tratado, o que quer dizer que a opsonização com soro de animal imunizado aumentou sensivelmente a captação de parasitas por macrófagos.

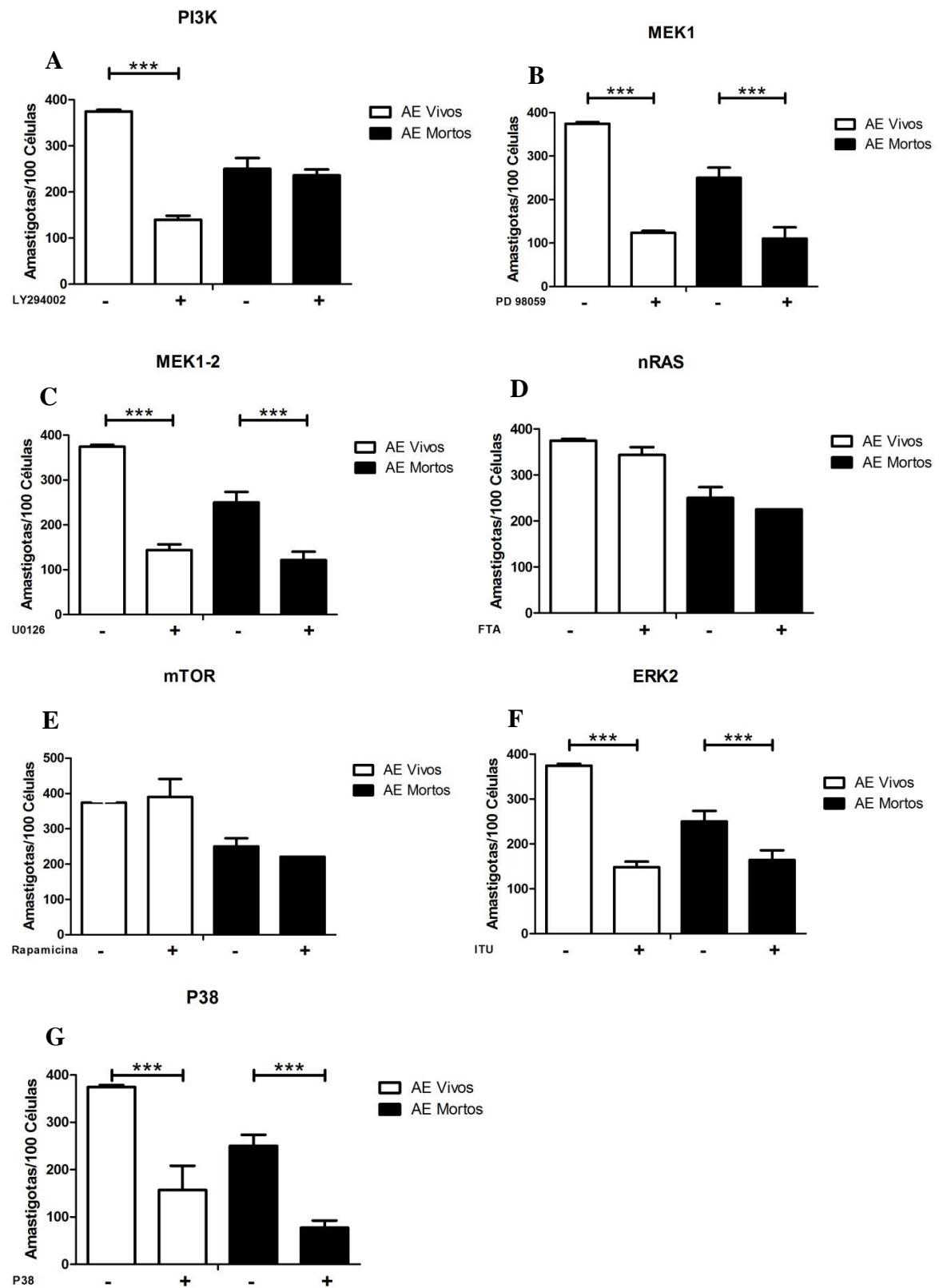
## AE Opsonizados



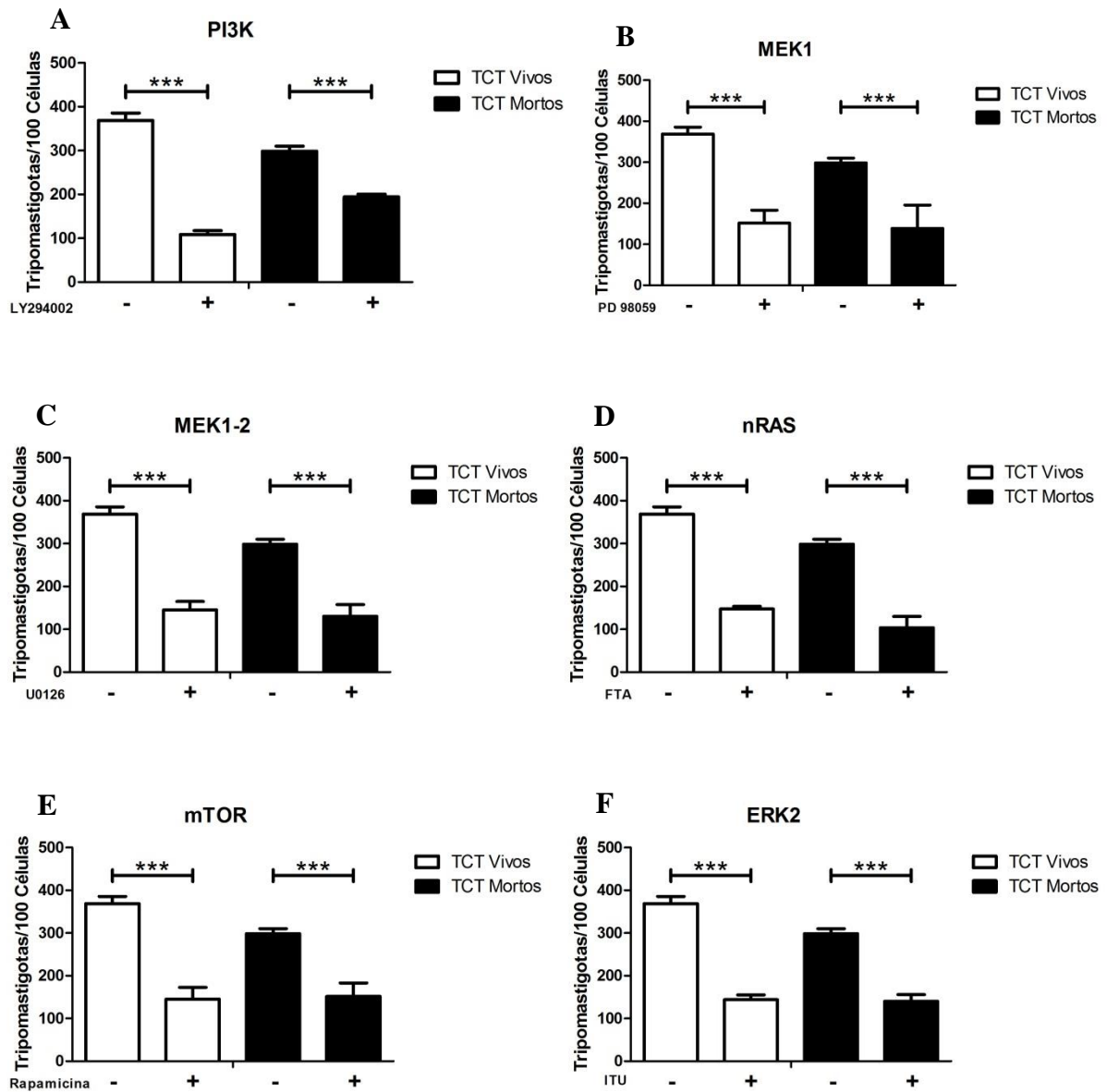
**Figura 19:** Resultado do ensaio de imunofluorescência com macrófagos, AE opsonizados e TCT opsonizados. Mesmo apesar dos macrófagos estarem sob efeito das drogas inibidoras a quantidade de parasitas internalizados foi grande em todas as vias estudadas, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle não tratado. O processo de opsonização aumentou a internalização das duas formas de desenvolvimento de *T. cruzi* estudadas, AE (A) e TCT (B).

Nossa análise também abrangeu o estudo das vias de transdução de sinais ativadas em macrófagos peritoneais nas situações em que eles foram expostos à invasão por formas AE e TCT vivas ou mortas, em ensaios distintos. Da mesma forma, a quantidade de parasitas internalizados foi quantificada a cada 100 células e os resultados estão representados nos gráficos a seguir.





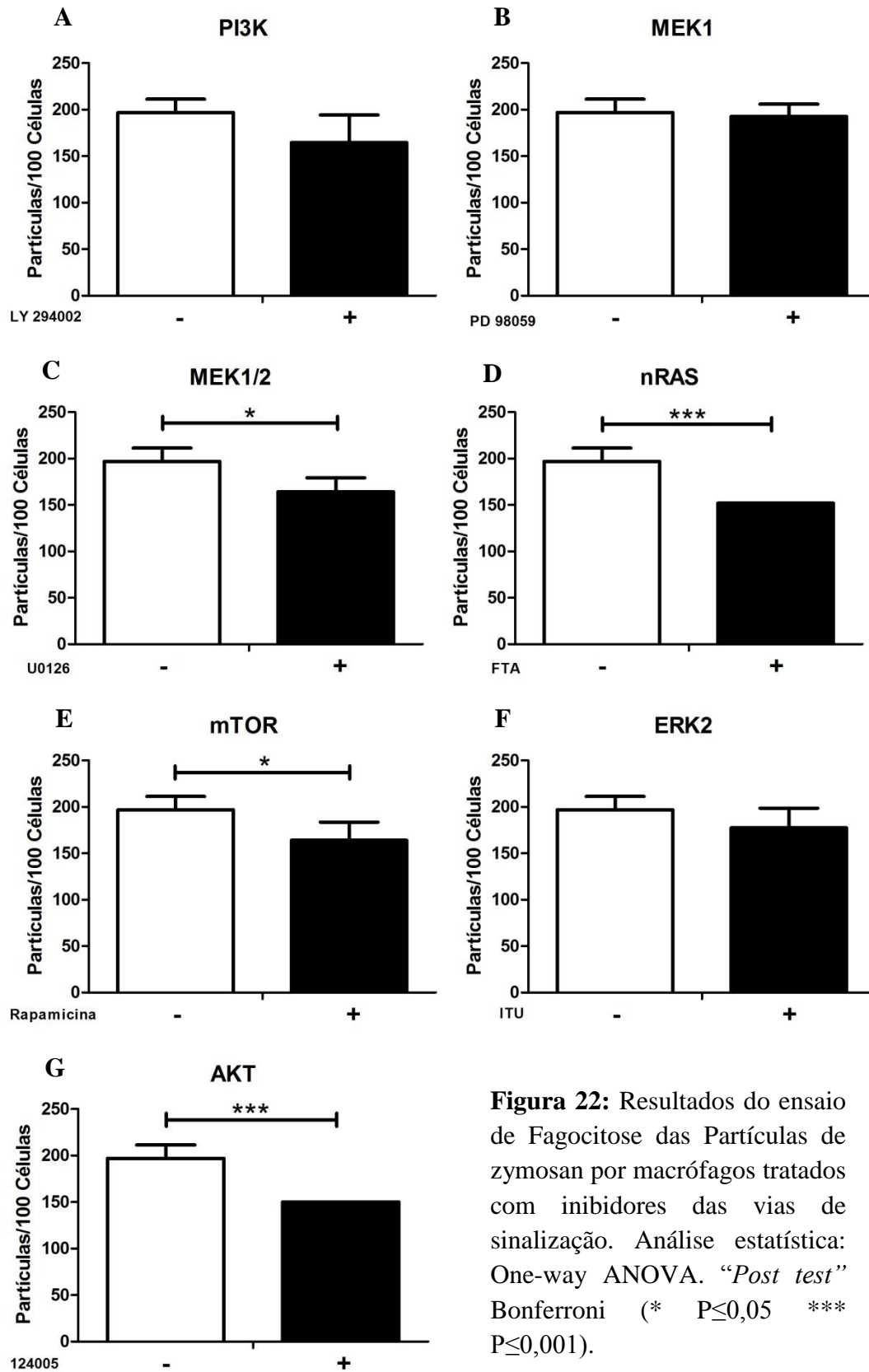
**Figura 20:** Resultados do ensaio de internalização dos AE vivos e mortos por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização. Análise estatística: One-way ANOVA. “*Post test*” Bonferroni (\*\*\*)  $P \leq 0,001$ ).



**Figura 21:** Resultados do ensaio de internalização dos TCT vivos e mortos por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização. Análise estatística: One-way ANOVA. “*Post test*” Bonferroni (\*\*\*)  $P \leq 0,001$ .

### 5.11 Ensaio de fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização.

Pensando no caso de parasitas mortos terem ativado as vias de sinalização celular diferentes daquelas ativadas por parasitas vivos, realizamos ensaios de fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização e comparamos o resultado com os obtidos nos ensaios com parasitas mortos.



**Figura 22:** Resultados do ensaio de Fagocitose das Partículas de zymosan por macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização. Análise estatística: One-way ANOVA. “Post test” Bonferroni (\*  $P \leq 0,05$  \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).

Os resultados da Figura 23 mostram que a quantidade de partículas de zymosan internalizadas foi menor naqueles macrófagos tratados com os inibidoras das vias de

sinização de MEK1/2, mTOR, RAS e AKT, o que indica o envolvimento destas vias na internalização destas partículas. Obtivemos resultados semelhantes nos ensaios de invasão em que usamos macrófagos peritoneais tratados com inibidores e formas AE e TCT mortas pelo calor, onde constatamos que AE mortos foram menos internalizados naquelas células tratadas com inibidores de MAPKs, e TCT foram menos internalizadas nas células tratadas com inibidores de MAPKs, PI3K, Ras e mTOR.

**Tabela 3** – Vias de sinalização celular ativadas em macrófagos por *T. cruzi* cepa G e partículas de zymosan

Parasitas/ Partículas	Vias de sinalização celular ativadas						
	PI3K	Proteínas quinase ativadas por mitógenos			RAS	mTOR	
Amastigotas Opsonizados	-	-	-	-	-	-	-
Amastigotas vivos	PI3K	MEK1	MEK1/2	ERK2	p38	-	-
Amastigotas mortos	-	MEK1	MEK1/2	ERK2	p38	-	-
Tripomastigotas opsonizados	-	-	-	-	-	-	-
Tripomastigotas vivos	PI3K	MEK1	MEK1/2	ERK2	p38	Ras	mTor
Tripomastigotas mortos	PI3K	MEK1	MEK1/2	ERK2	p38	Ras	mTor
Partículas de zymosan	-	-	MEK1/2	-	-	Ras	mTor

Fonte: Laboratório de Tripanosomatídeos-UFU

Nota: - Via de sinalização não ativada.

## 6.0 DISCUSSÃO

### 6.1 O renovelamento da P21-His<sub>6</sub> gera uma proteína biologicamente ativa

A P21-His<sub>6</sub> é uma proteína recombinante baseada na forma nativa secretada pelo parasita *T. cruzi*. Para estudar, caracterizar e descobrir as funções biológicas dessa proteína Silva et al. (2009) teve que clonar o gene da proteína nativa, inseri-lo no vetor pET28a(+), transformar a bactéria *E. coli* de modo que ela pudesse expressar a proteína em quantidades satisfatórias para efetuar estudos biológicos. Todo esse processo resultou na elaboração de um protocolo que descreve o método de purificação da proteína recombinante a partir dos corpos de inclusão do extrato bacteriano, trata-se do “Protocolo de purificação e renovelamento da mP21-His<sub>6</sub>”, o qual está descrito neste trabalho.

Por meio do protocolo de renovelamento os corpos de inclusão são dissolvidos em solução de Ureia 6M que desnatura as proteínas, para posteriormente realizarmos a cromatografia de afinidade em coluna de Níquel e diálise contra tampão PBS, sendo que esta última etapa vai remover o excesso de ureia e imidazol do eluído fazendo com que a proteína recupere sua estrutura secundária, este processo é chamado de “*Refolding*” ou renovelamento. Este protocolo está de acordo com o que Yang et al. (2011) estabelece quando diz que para obter proteínas ativas a partir de corpos de inclusão é preciso dissolvê-lo numa solução desnaturante e depois submetê-las a uma etapa de renovelamento.

Da mesma forma Alibolandi e Mirzahoseini (2011) preconizam que para obter a proteína ativa a partir dos corpos de inclusão quatro passos são necessários: o isolamento destes corpos por centrifugação, sua solubilização usando soluções desnaturantes, a purificação e o renovelamento realizado em condições especiais.

Recentemente a equipe do Instituto de Física da USP de São Carlos-SP elaborou um protocolo alternativo de purificação da P21-His<sub>6</sub> obtendo a proteína a partir da fração solúvel do extrato bacteriano de *E. coli*. Obtivemos o perfil cromatográfico da proteína purificada por este método a partir do sistema de purificação AKTA Purifier. Por não ter sido submetida a condições desnaturantes a proteína já está na sua estrutura conformacional correta, sendo desnecessário submetê-la a processos de renovelamento.

Neste trabalho mostramos a imagem de um gel de poliacrilamida em que destacamos das bandas da mP21-His<sub>6</sub> e sP21-His<sub>6</sub>, presentes na fração insolúvel e solúvel do extrato bacteriano respectivamente. Percebe-se que a banda que representa a proteína na fração

insolúvel é maior que a banda da fração solúvel, sugerindo que há uma quantidade muito maior de P21-His<sub>6</sub> nos corpos de inclusão em relação à fração solúvel do extrato bacteriano.

Por dispormos de dois métodos de purificação surgiram várias dúvidas a serem esclarecidas, como: o processo de purificação que usa o método de renovamento fornece a proteína na conformação correta? A proteína purificada a partir da fração solúvel (sP21-His<sub>6</sub>) possui as mesmas funções biológicas que a proteína obtida por renovamento (rnP21-His<sub>6</sub>)? Qual protocolo de purificação é mais adequado para laboratórios pequenos e com recursos limitados? Assim, boa parte deste trabalho foi dedicada a obter respostas a essas perguntas.

Para verificar a capacidade da P21-His<sub>6</sub> de recuperar sua estrutura secundária após ser desnaturada realizamos a Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular submetendo a proteína à ação do calor, aquecendo-a de 20°C até 80°C e depois resfriando até 37°C. Pelo espectro obtido verificamos que a partir de 60°C a proteína perde sua estrutura secundária, tanto é que a 80°C o perfil do espectro contrasta completamente dos demais indicando a perda de sua conformação. Porém, ao resfriarmos a amostra até 37°C constatamos que o perfil do espectro referente a esta temperatura retorna próximo ao estado inicial, evidenciando que uma fração significativa da proteína recupera gradativamente sua estrutura secundária após ser resfriada.

A sP21-His<sub>6</sub> purificada a partir da fração solúvel encontra-se na estrutura conformacional nativa, pois não foi submetida a condições desnaturantes. Para verificar se a rnP21-His<sub>6</sub> recuperaria sua estrutura tridimensional correta, após a etapa de renovamento do processo de purificação, usamos novamente a Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular para comparar os espectros das duas amostras da proteína à 20°C. Os espectros obtidos são bem similares estando intimamente próximos, sugerindo que a rnP21-His<sub>6</sub> e a sP21-His<sub>6</sub> possuem a mesma estrutura secundária. Por este mesmo método Wang e Engel (2009) compararam a glicose-6-fosfato desidrogenase nativa e renovada e verificaram que a estrutura secundária da amostra obtida por renovamento era indistinguível da forma nativa da enzima.

Da mesma forma, Alibolandi e Mirzahoseini (2011) estudando a purificação e o renovamento do fator de crescimento de fibroblastos humanos comparou a forma nativa e de renovamento por Dicroísmo Circular e obtiveram espectros similares de ambas as amostra. O que deixa claro que alguns pesquisadores se valem deste método para comparar formas nativas de proteínas com formas obtidas por renovamento a partir de corpos de inclusão, ou fração insolúvel do extrato bacteriano de *E. coli* para comprovar que possuem a mesma estrutura.

Porém, apesar da similaridade dos espectros, os dados obtidos com o Dicroísmo Circular foram enriquecidos com resultados de outros ensaios que fizemos comparando as amostras. Imunizamos camundongos BALB/C contra sP21-His<sub>6</sub> para obtermos o soro contendo anticorpos policlonais contra essa proteína, ao testarmos o soro verificamos com ensaios de imunofluorescência que os anticorpos se ligaram à proteína satisfatoriamente. Realizamos outros ensaios de imunofluorescência com esse mesmo soro e constatamos que os anticorpos policlonais anti-sP21-His<sub>6</sub> também reconheceram e se ligaram à rnP21-His<sub>6</sub>, em relação ao soro de animal saudável não imunizado que usamos como controle nas duas situações.

Usamos o soro com anticorpos policlonais capazes de reconhecer a P21 recombinante purificada a partir de ambos os protocolos e realizamos mais dois ensaios, um Dot blot e um Western Blot, comparando as duas proteínas nas situações em que elas estavam íntegras e desnaturadas pelo calor a 100°C por cinco minutos. Os dois experimentos mostraram que os anticorpos marcaram as proteínas nas duas condições.

O processo de endocitose é essencial para todas as células eucarióticas, por meio deste mecanismo as células internalizam nutrientes, antígenos, patógenos e receptores de superfície, a partir da membrana celular para o interior de vesículas endocíticas que estão envolvidas nos mais diversos processos celulares como promover a homeostasia, sinalização celular e o desenvolvimento. Mecanismos distintos controlam a captação de uma grande variedade de partículas de diferentes tamanhos, sejam pequenas moléculas a vírus ou bactérias (KRAUS; HAUCKE, 2012).

Silva et al. (2009) realizando ensaios distintos de invasão celular utilizando formas TCT e AE das cepas G e CL de *T. cruzi*, utilizando células não fagocíticas (HeLa) como hospedeiras, incubadas com rnP21-His<sub>6</sub>, constatou que o tratamento com esta proteína promovia o aumento da internalização das duas formas do parasita. Tendo em vista verificar se a sP21-His<sub>6</sub> apresentava essa mesma propriedade realizamos ensaios de invasão celular de células Vero (também não fagocíticas), tratadas ou não com essa proteína, com parasitas da cepa CL de *T. cruzi* nas formas TCT e AE, verificamos que nas duas situações o tratamento com a sP21-His<sub>6</sub> promovia o aumento da internalização de ambas as formas do parasita nas células Vero, quando comparado com o controle não tratado, estes resultados estão de acordo com os achados publicados por Silva et al. (2009).

Em Rodrigues et al. (2012) nosso grupo estudou a relação existente entre a rnP21-His<sub>6</sub>, o processo de invasão celular e a fagocitose, verificamos em ensaios distintos que esta proteína foi capaz de aumentar a invasão de outros tipos de parasitas intracelulares

(*Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii*), assim como estimulou a fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos. Restava saber se a sP21-His<sub>6</sub> também seria capaz de estimular os macrófagos a aumentarem a internalização de partículas de zymosan através do processo fagocítico, fizemos ensaios de fagocitose por macrófagos peritoneais tratados ou não com sP21-His<sub>6</sub> e incubados com partículas de zymosan. Confirmamos que a sP21-His<sub>6</sub>, tal como a rnP21-His<sub>6</sub>, também estimulava o processo fagocítico aumentando a internalização de partículas de zymosan de forma intensa.

De posse destes resultados constatamos que a rnP21-His<sub>6</sub> e a sP21-His<sub>6</sub> possuem a mesma estrutura secundária e as mesmas propriedades biológicas, evidenciando que embora a rnP21-His<sub>6</sub> tenha sido purificada a partir de um processo de renovelamento este foi completamente satisfatório. Pois segundo Willis et al. (2005) a produção de proteínas eucarióticas solúveis e funcionais é um desafio com uma baixa taxa de sucesso em expressar proteínas solúveis eucarióticas em relação às procarióticas, sendo que uma alternativa promissora para se obter quantidades suficientes de proteína solúvel é o renovelamento de proteínas insolúveis presentes nos corpos de inclusão da *E. coli*, sendo que a literatura mostra que podemos obter numerosas proteínas nas suas formas ativas através do renovelamento das mesmas.

Ao compararmos o rendimento dos dois protocolos de purificação, tendo por base os dados de rendimento da Tabela 1, a quantidade de proteína obtida em cinco purificações distintas realizadas separadamente com cada protocolo, apresentou um rendimento maior quando utilizamos o processo de renovelamento. Pois, além de fornecer uma quantidade maior de proteína o Protocolo de purificação e renovelamento da rnP21-His<sub>6</sub> é mais viável para os laboratórios que se disporem a estudar essa proteína, mas possuem recursos limitados, pois este método consome menos material e dispensa o uso de tecnologia sofisticada de purificação. Não pretendemos aqui mostrar que um protocolo é melhor do que o outro, apenas deixar evidente que os dois protocolos são bem sucedidos em fornecer a proteína biologicamente ativa.

Em relação à P21-His<sub>6</sub>, a última questão a ser esclarecida pelo nosso trabalho é saber quais as vias de sinalização são ativadas por esta proteína. Realizamos ensaios de fagocitose, em que utilizamos macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongo C57BL/6 tratados e não tratados com a proteína, drogas inibidoras das vias de sinalização e incubados com partículas de zymosan. Posteriormente efetuamos a contagem do número de partículas internalizadas pelos macrófagos, os resultados mostram que a capacidade da P21-His<sub>6</sub> de estimular a fagocitose é dependente da via de PI3K, uma vez que a proteína recombinante não



mostrou atividade pró-fagocítica na situação em que os macrófagos foram tratados com o inibidor LY294002, o qual inibe a via da PI3K.

Também verificamos que houve uma pequena diferença estatisticamente relevante nos casos em que os macrófagos foram tratados com a proteína e os inibidores das vias de sinalização de mTOR e ERK2 em relação ao controle não tratado. Como já esperávamos, em todos os casos em que macrófagos foram tratados apenas com a P21-His<sub>6</sub> constatamos novamente que a quantidade de partículas internalizadas era muito maior em relação aos não-tratados. As demais vias de sinalização avaliadas (AKT, n-Ras, MEK1 e MEK1/2) não mostraram diferenças em relação aos controles não-tratados. Estes dados foram publicados em Rodrigues et al. (2012).

## 6.2 Sinalização celular ativada durante a invasão de *T. cruzi* cepa G

Pesquisadores que se dedicam a estudar os eventos de transdução de sinais envolvidos na interação *T. cruzi*-célula hospedeira devem levar em conta várias especificidades que envolvem não só o parasita, mas também o tipo de célula hospedeira usada nos ensaios. Ou seja, cepas diferentes do parasita possuem estratégias diferentes de invasão e provocam respostas celulares e eventos de sinalização próprios. Mas as diferenças não restringem apenas a cepas diferentes, formas diferentes de desenvolvimento de uma mesma cepa induzem respostas celulares distintas nas células, e o tipo de células hospedeiras usadas nos ensaios responde de uma maneira própria à invasão (PROCÓPIO et al., 1998; EPTING; COATES; ENGMAN, 2010; LIMA et al., 2010; MORTARA et al., 2005; FERNDES et al., 2006).

A invasão de células Vero ou células HeLa por formas AE e a invasão destas mesmas células por formas tripomastigotas metacíclicos utilizam mecanismos de invasão celular distintos uma da outra. No processo de invasão de células hospedeiras formas tripomastigotas metacíclicos das cepas G e CL diferem amplamente na sua infectividade, ligam-se a moléculas distintas na superfície de células hospedeiras (FERNANDES et al., 2006).

Amostras de *T. cruzi* das cepas G e CL apresentam diferenças nas suas habilidades de invadir células hospedeiras. Em tripomastigotas metacíclicos, as formas de desenvolvimento que iniciam a infecção em células hospedeiras, a variabilidade entre essas amostras está associada com a expressão diferencial de glicoproteínas de superfície, as quais se ligam às células alvo e exibem atividades de sinalização dependentes de Ca<sup>2+</sup> distintas. Uma possibilidade interessante é que a interação entre essas moléculas com seus receptores ativem

diferentes vias de sinalização em formas metacíclicas de *T. cruzi*, mostrando diferentes estratégias de invasão celular (NEIRA; FERREIRA; YOSHIDA, 2002).

Assim, numa mesma cepa do parasita pode haver ativação de vias de sinalização distintas, que podem variar também em células hospedeiras diferentes. As vias de sinalização ativadas pela invasão de células HeLa por formas amastigotas de *T. cruzi* são distintas das rotas usadas pelas formas tripomastigotas metacíclicas das cepas G e CL. As drogas que afetam diferencialmente a invasão das formas tripomastigotas metacíclicas de ambas as cepas tiveram pouco ou nenhum efeito sobre as formas amastigotas (EPTING; COATES; ENGMAN, 2010; FERNANDES et al., 2006).

Formas tripomastigotas metacíclicas, TCT e AE de *T. cruzi* expressam proteínas de superfície diferentes, e cada uma provavelmente ativa uma via de sinalização distinta. Pois Segundo Mortara et al. (2005), estudos com cepas de *T. cruzi* I e II mostram que a expressão de epítomos definidos por anticorpos monoclonais pode variar consideravelmente entre amastigotas intracelulares e extracelulares de ambas as cepas.

Para Kahn et al. (1996) vários estudos mostram que glicoproteínas de superfície contribuem para a adesão e invasão de células hospedeiras, estudos de ultraestrutura indicam que formas amastigotas de *T. cruzi* e tripomastigotas se ligam a diferentes regiões na célula hospedeira sugerindo que estas duas formas expressam diferentes componentes de superfície que levam a diferentes mecanismos de adesão e invasão. A transialidase de *T. cruzi* é expressa em tripomastigotas e não em amastigotas, decora tripomastigotas com ligantes de ácido siálico que participam no processo de invasão de células hospedeiras por estas formas. Receptores de manose facilitam a entrada de formas amastigotas em macrófagos, todos os estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* expressam glicoproteínas de superfície conjugadas com manose, só que formas amastigotas expressam glicoproteínas conjugadas com manose distintas daquelas expressas por formas tripomastigotas e epimastigotas.

Varias estratégias usadas pelo parasita, incluindo o uso de diferentes formas infectivas (tripomastigotas metacíclicas, TCT e AE), distintas cepas, assim como diferentes capacidades infectivas, provam ser um obstáculo difícil de ultrapassar. Embora a variedade de células hospedeiras e componentes do parasita envolvidos na invasão de formas tripomastigotas sejam bem conhecidos, os componentes que participam no processo de invasão de formas amastigotas estão somente começando a ser descobertos (LIMA et al., 2010).

### 6.2.1 Parasitas opsonizados

Nos ensaios de invasão de macrófagos por formas AE e TCT de *T. cruzi* opsonizados verificamos uma grande quantidade de parasitos internalizados, mesmo apesar dos macrófagos estarem sob efeito do tratamento com as drogas inibidoras das vias de sinalização. Antes da invasão, AE e TCT foram incubados por uma hora com soro de animais imunizados contra essas formas do parasita. A eficiência dos anticorpos policlonais do soro em marcar os parasitas adequadamente foi testada com resultados satisfatórios.

Acreditamos que a grande quantidade de parasitas internalizados pelos macrófagos seja devido à ativação do receptor  $Fc\gamma$  dos macrófagos pelos anticorpos presentes na superfície dos parasitas e também devido à ação de proteínas secretadas pelo parasita que promovem e facilitam sua internalização em macrófagos, como por exemplo, a proteína P21 (SILVA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2012) e o  $Ca^{+2}$  agonista (CALER et al., 1998).

De acordo com Sharfstein e Morrot (1999) dependendo do isotipo e da especificidade do anticorpo a opsonização pode ocorrer e assim aumentar a captação de parasitas por macrófagos. Segundo Sánches-Mejorada e Rosales (1998) os receptores  $Fc\gamma$  de imunoglobulinas são diferentes de outros receptores, a ligação de imunocomplexos polivalentes como células opsonizadas a estes receptores resulta numa ativação celular efetiva que leva à fosforilação de vários resíduos de tirosina nas caudas citoplasmáticas, que uma vez ativadas catalisam a fosforilação e ativação de vários substratos como a Fosfolipase  $C\gamma 1$ , PI3K, a MAPK, etc; sendo que o substrato específico envolvido depende do tipo de célula, da função celular ativada, e do tipo particular de receptor envolvido.

De acordo com Vieira, Carvalho e Souza (1994) inibidores de proteínas quinase como a genisteína e estaurosporina podem inibir a infecção por *T. cruzi* de macrófagos tratados com essas drogas, para eles a fosforilação de resíduos de tirosina é um etapa crítica na sinalização celular mediada pelo receptor Fc no processo de fagocitose por macrófagos, sendo que inibidores de proteínas quinase, especialmente tirosina quinase, bloquearam a invasão destas células.

Nos ensaios com parasitas opsonizados, os anticorpos policlonais provenientes do soro de animais imunizados se ligaram à superfície dos parasitas formando imunocomplexos que foram reconhecidos pelos receptores Fc dos macrófagos, o que pode ter disparado a sinalização via Fosfolipase C deste receptor, a qual não estava inibida por drogas, promovendo a captação dos parasitas por fagocitose dependente do rearranjo do citoesqueleto de actina. Além disso, o processo de opsonização não interferiria com a capacidade dos

parasitas de secretar proteínas úteis ao processo de invasão, como a proteína P21, que também poderia intensificar o processo de fagocitose por meio da sua ligação ao receptor acoplado à proteína G, chamado CXCR4 que também pode sinalizar via Fosfolipase C.

Os anticorpos policlonais que marcaram os parasitos na opsonização aumentaram a probabilidade do reconhecimento dos patógenos pelos macrófagos ter ocorrido por meio dos anticorpos presentes na superfície dos parasitas opsonizados. Segundo Burleigh e Andrews (1995) complemento e opsonização com anticorpos, entre outros fatores, exercem um importante papel na infecção *in natura* e a opsonização dos parasitas com anticorpos policlonais resulta numa ligação mais eficiente à superfície das células que expressam o receptor Fc e facilita a invasão.

De acordo com Aderem e Underhill (1999) muito do nosso entendimento sobre as principais vias de sinalização envolvidas na fagocitose por macrófagos vieram de estudos com o receptor Fc. Os receptores Fc responsáveis pela fagocitose por macrófagos humanos são Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA e Fc $\gamma$ RIII. Os receptores Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIIIA possuem um domínio Fc extracelular, mas carecem da porção ITAMs (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) em suas caudas intracelulares. Dessa forma, para uma adequada expressão e sinalização estes receptores precisam interagir com pequenas proteínas transmembrana que possuem porções ITAM necessárias para a transdução de sinal, resultado de ligações cruzadas e fosforilação de resíduos de tirosina nos domínios ITAM das suas subunidades  $\gamma$ .

A proteína tirosina quinase responsável por essa fosforilação inicial é um membro da família Src. Subsequentemente uma segunda proteína quinase, a p72Syk, é recrutada para os domínios ITAMs fosforilados, isso ativa a Syk quinase, a qual por sua vez ativa uma multiplicidade de vias relacionadas à transcrição, rearranjo do citoesqueleto e libera mediadores inflamatórios. O mecanismo pelo qual os receptores Fc $\gamma$  estimulam a polimerização do citoesqueleto de actina e a formação do fagossomo é pouco conhecido, embora a via da PI3K, a Fosfolipase C, a família rho de GTPases, a PKC e proteínas motoras parecem participar. Proteínas de citoesqueleto como F-actina, vinculina, actinina alfa, paxilina e proteínas contendo fosfotirosina estão difusamente distribuídas em fagossomos contendo partículas revestidas com IgG, sendo que a fagocitose mediada pelo receptor Fc $\gamma$  é bloqueada por inibidores de PKC e inibidores de tirosina quinase (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

No caso da proteína P21 secretada pelos parasitas, conforme Rodrigues et al. (2012) esta proteína induz o processo fagocítico e o rearranjo do citoesqueleto de actina em macrófagos peritoneais, durante a internalização de *T. cruzi*, por se ligar ao receptor acoplado à proteína G conhecido como CXCR4 e ativar a via de sinalização da PI3K. Porém, neste

ensaio tratamos os macrófagos peritoneais com a droga LY294002, a qual inibe a via de PI3K. Então, neste caso, estaria a função da proteína P21 anulada? Pensamos que não, pois a sinalização disparada pelo receptor CXCR4 ativado é complexa, ramificada e relaciona-se à ativação de várias outras proteínas, entre elas a Fosfolipase C $\beta$ .

Segundo García-Garcia e Rosales (2002) a Fosfolipase C $\gamma$  usa PIP2 para a geração de IP3 e DAG. O IP3 induz a liberação de Ca<sup>2+</sup> a partir dos estoques intracelulares, e o DAG é necessário para a ativação de várias isoformas de PKC. A ativação da Fosfolipase C $\gamma$  via receptor Fc $\gamma$  já foi descrita em outros estudos e inibidores desta enzima prejudicam a fagocitose por macrófagos, sendo que o exato papel da Fosfolipase C $\gamma$  na fagocitose ainda não está claro.

Segundo Teicher e Fricker (2010) o CXCR4 é amplamente expresso em células hematopoiéticas, inclusive monócitos e macrófagos, sendo que a ativação deste receptor é mediada pelo seu acoplamento a uma proteína-G intracelular e heterotrimérica localizada na superfície interna da membrana plasmática. Esta proteína-G é formada pelas subunidades G $\alpha$ , G $\beta$  e G $\gamma$  ligadas a uma GDP, quando ativada por um ligante o GDP se converte a GTP e ocorre a dissociação das subunidades  $\beta\gamma$  da subunidade  $\alpha$ GTP. A subunidade G $\alpha$  está dividida em quatro famílias: Gas, Gai, Gaq e G $\alpha$ 12, cada uma relacionada a diferentes rotas. A família Gaq age via Fosfolipase C (PLC), como a PLC $\beta$ , que hidrolisa PIP2 para gerar dois segundos mensageiros, o IP3 e o DAG, os quais aumentam a concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup> livre e ativam um grande número de proteínas quinases, especialmente a PKC (GARCIA-GARCIA; ROSALES, 2002).

Assim, acreditamos que a proteína P21 secretada pelo *T. cruzi* age também via PLC $\beta$ , uma vez que a via da PI3K estava inibida, a PLC $\beta$  por sua vez hidrolisa PIP2 formando IP3, que aumenta a concentração citosólica de cálcio (uma condição essencial para a invasão do parasita), e também DAG que ativa a PKC. Um dos substratos da PKC são as MARCKS (Myristoylated, alanine-rich, C-kinase substrate), proteínas de ligação à actina, que estão envolvidas nas vias de sinalização do complexo cálcio/calmodulina e também PKC. Quando não estão fosforiladas elas se ligam à actina promovendo ligações cruzadas entre os filamentos, quando são fosforiladas promovem a desmontagem da actina. PKC e MARCKS são recrutadas durante a formação do fagossomo, as MARCKS possui um importante papel modulando as ligações cruzadas dos filamentos de actina durante a internalização de partículas sendo reguladas pela PKC, pois a inibição da PKC bloqueia a internalização de partículas de zymosan (ALLEN; ADEREM, 1995).

O aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é necessário para a internalização dos parasitas, sendo que a desmontagem da F-actina durante a invasão por formas TCT de *T. cruzi* é uma consequência direta deste aumento. O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é mobilizado em células hospedeiras devido à ativação de uma via de transdução de sinal induzida pelo parasita e necessária para sua internalização. Extratos provenientes de AE das cepas G e CL aumentaram os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de forma dose dependente em células HeLa, indicando que AE das duas cepas ativam a sinalização dependente de cálcio nestas células, o que pode ter um importante papel no sucesso da invasão destas formas (FERREIRA et al., 2006; FERNANDES et al., 2006; FERREIRA et al., 2012).

De acordo com Maeda et al. (2012) formas TCT do parasita secretam um fator de estrutura desconhecida capaz de ativar a mobilização das reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  das células hospedeiras de forma dependente de IP3. Dessa forma, a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  pela célula hospedeira é um importante fator para a internalização de *T. cruzi* (SOUZA et al., 2010; MANQUE et al.; 2003).

Aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular na célula hospedeira é necessários para o processo de invasão por *T. cruzi* pela via lisossomal, tripomastigotas promovem o aumento de cálcio intracelular em uma grande variedade de células hospedeira de mamíferos, tamponamento ou depleção de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular inibe significativamente a invasão de células de mamíferos por tripomastigotas. A oligopeptidase B é uma enzima citosólica de *T. cruzi* que age sobre um substrato gerando uma  $\text{Ca}^{+2}$  agonista que é liberada pelo parasita, liga-se a um receptor na superfície da célula hospedeira ativando a PLC que gera IP3, o qual se liga a um receptor no retículo endoplasmático e promove a liberação de  $\text{Ca}^{+2}$  para o citoplasma, que estimula o recrutamento e fusão de lisossomos no sítio de invasão da célula hospedeira (CALER et al., 1998).

Acreditamos que nestes ensaios com parasitas opsonizados e macrófagos tratados com inibidores das vias de sinalização, a via de sinalização da FLC pode estar sendo ativada tanto pela ligação dos imunocomplexos ao receptor Fc, quanto pelas proteínas P21 (ligando-se ao receptor CXCR4) e o  $\text{Ca}^{+2}$  agonista. Como a via da Foslipase C não foi estudada neste trabalho ela será alvo de futuras investigações para confirmar seu envolvimento e importância.

### 6.2.2 Parasitas vivos e mortos

Nos ensaios em que tratamos macrófagos peritoneais com as drogas inibidoras das vias de sinalização e em seguida incubamos estas células com formas AE vivas e mortas pelo calor, verificamos que nos ensaios com AE vivos a invasão é dependente das vias de sinalização de PI3K e MAPKs, pois nas situações em que os macrófagos foram tratados com os inibidores destas vias a internalização de parasitas foi menor em comparação ao controle não tratado. O que está de acordo com vários estudos que confirmaram a importância das vias de sinalização de PI3K e MAPKs no processo de invasão das células hospedeiras por *T. cruzi* (MAEDA et al. 2012; FERNANDES et al., 2003; WOOLSEY et al., 2003; AOKI et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2004; TODOROV et al., 2000).

Segundo Woolsey et al. (2003) a modulação da via de PI3K da célula hospedeira por microorganismos parasitas é considerada uma importante estratégia para infectar e sobreviver no meio intracelular da célula hospedeira, a invasão de *T. cruzi*, ativa a via de PI3K para uma eficiente internalização em células não-fagocíticas e macrófagos.

Segundo Fernandes et al. (2006) a ativação de PI3K é necessária para a invasão de células HeLa por formas AE das cepas G e CL de *T. cruzi*, sendo que o tratamento destas células com a droga wortmanina reduziu a infectividade dos AE, isso sugere que a atividade desta via de sinalização é necessária ao processo de invasão de AE em células não fagocíticas. Barrias et al. (2010) também descreveu que o uso de drogas inibidoras da via de PI3K prejudicou em 60% a internalização de AE da cepa Y em macrófagos peritoneais.

Conforme Maeda et al. (2012) em diferentes tipos de células a ativação de PI3K emerge como uma característica comum no processo de invasão também das formas TCT, a ativação desta via em células não fagocítica facilita a entrada do parasita por uma via dependente dos lisossomos, sendo que no caso dos macrófagos detectou-se a ativação da via de PI3K e rearranjo do citoesqueleto no sítio de invasão destas células por formas TCT.

De acordo com Aoki et al. (2006) múltiplos eventos de transdução de sinais são ativados na célula hospedeira durante a invasão de *T. cruzi*, moléculas presentes na superfície das formas tripomastigotas são capazes de ativar as vias de PI3K /AKT em células fagocíticas e não fagocíticas, também muitas evidências sugerem que os membros da família das MAPKs, incluindo as ERKs, JNK e p38 MAPK exercem um importante papel na sobrevivência e morte celular, sendo que as vias de MEK1/ERK estão envolvidas na invasão de *T. cruzi* em cardiomiócitos.

Para Mukherjee et al. (2004) as vias de MAPK exercem um importante papel na regulação celular, principalmente na resposta imune, proliferação celular e invasão microbiana de células de mamíferos, vários estudos mostram que as vias da MAPK são ativadas como resultado da interação parasita-hospedeiro.

Conforme Todorov et al. (2000) a invasão celular por *T. cruzi* induz a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas de macrófagos, assim como ativação de MAPK, e bloqueio da proteína tirosina quinase e MAPK de macrófagos com inibidores evita a infecção destas células pelo parasita, sugerindo que a ativação destas vias é um importante evento neste processo.

Ao analisarmos os resultados dos AE mortos duas situações chamaram nossa atenção. Primeiro vimos que a internalização dos parasitas AE mortos é dependente da via das MAPKs, mas não da via de PI3K. Segundo, quando comparamos as barras referentes aos AE vivos e mortos, verificamos que os parasitas vivos internalizam mais que os parasitas mortos.

A explicação para esse resultado pode estar relacionada também à proteína P21, a qual é secretada por formas AE a fim de facilitar sua fixação, estimular a fagocitose e promover a entrada na célula hospedeira (SILVA et al., 2009) ativando a via de PI3K (RODRIGUES et al.; 2012), parasitas mortos não podem secretar essa proteína, logo o envolvimento da via de PI3K ativada por essa proteína não foi verificado nos ensaios com AE mortos.

Mas e a via das MAPKs? Os parasitas foram mortos pelo calor a uma temperatura de 100°C durante 15 minutos, então por que a via das MAPKs foi ativada? As proteínas de superfície do parasita foram desnaturadas pelo calor ou algumas permaneceram intactas? Caso tenham permanecido intactas elas ativaram alguma sinalização nos macrófagos? Podemos especular que as diferenças entre as vias ativadas por parasitas mortos durante sua internalização nos macrófagos possa estar relacionada a componentes de superfície do parasita que permaneceram intactos? Ou seria apenas devido a mecanismos intrínsecos dos macrófagos durante o processo de eliminação de células mortas por fagocitose? Estas questões envolvendo vias distintas ativadas por parasitas vivos e mortos, assim como a integridade e o papel das proteínas dos parasitas mortos na sinalização celular serão investigadas em estudos posteriores.

De qualquer forma, nos AE vivos a ativação das MAPKs pode ter sido induzida pelo parasita, mas no caso de AE mortos, como exposto acima, a ativação das MAPKs pode estar relacionada a mecanismos intrínsecos dos macrófagos durante o processo de fagocitose dos parasitas mortos, ou proteínas de superfície do parasita que podem ter resistido ao calor ou recuperaram sua estrutura e ativaram alguma sinalização na célula hospedeira. Um



mecanismo próprio dos macrófagos que pode estar ativo durante o processo de “faxina” realizado por essas células envolve a Fosfolipase A2.

Segundo García-García e Rosales (2002) várias Fosfolipases estão envolvidas na fagocitose por mecanismos ainda pouco conhecidos, a Fosfolipase A2 dependente de  $Ca^{2+}$ , participa do processo de fagocitose através da produção de ácido araquidônico que age como segundo mensageiro na fagocitose. Em neutrófilos e macrófagos a Fosfolipase A2 é regulada por ERK e p38, que pertencem à família das MAPKs. O papel da ERK na fagocitose ainda não está claro, mesmo assim em fagócitos a ERK pode ser ativada por PKC ou por PI3K. No caso de ser ativada por PKC o processo parece envolver a translocação de PKC e Raf-1 para a membrana plasmática, onde Raf-1 ativa MEK que por sua vez induz a ativação de ERK. Também, independente da via de ativação, a inibição de ERK pelo inibidor de ERK/MEK PD98059 abole a fagocitose em neutrófilos e macrófagos. A ativação de ERK por PI3K ainda precisa ser esclarecida.

No caso de macrófagos tratados com as drogas inibidoras das vias de sinalização e incubados com TCT vivos e mortos, o experimento foi executado nas mesmas condições empregadas na análise das formas AE. Verificamos o envolvimento das vias de transdução de sinais de PI3K, MAPKs, RAS e mTOR tanto no estudo de parasitas vivos quanto mortos.

As explicações que oferecemos para a situação dos AE vivos e mortos também se aplicam ao caso dos TCT no que diz respeito às vias de PI3K e MAPKs. Uma vez que formas TCT vivas também secretam a proteína P21 para induzir o processo fagocítico sendo que a via da PI3K é ativada neste caso. As MAPKs foram ativadas tanto nos ensaios com TCT vivos, quanto mortos, assim esta via pode ter sido ativada pelos parasitas vivos, e no caso dos parasitas mortos a via pode ter sido ativada por componentes de superfície que resistiram ao calor ou apenas como parte do processo fagocítico dos macrófagos, sem que tenha havido participação ativa dos parasitas mortos, isso será esclarecido em ensaios que realizaremos no futuro.

Mas e as vias de Ras e mTOR que foram ativadas nos ensaios com TCT vivos e mortos? Esse resultado pode ter sido influenciado pelos parasitas vivos, pode estar relacionado a mecanismos próprios dos macrófagos ou por componentes de superfície intactos no caso dos parasitas mortos, o envolvimento destas vias na invasão do parasita e no processo fagocítico precisa ser mais explorado.

TCT vivos poderiam ativar a via de sinalização de Ras? Mukherjee et al. (2004) estudando a invasão de células endoteliais da veia umbilical e células musculares lisas do sistema vascular, por formas TCT de *T. cruzi* da cepa Tulahuen, verificou que a via de

sinalização Ras-Raf-ERK foi ativada. A infecção destas células resultou na ativação sustentada de ERK1/2, quando elas foram tratadas com o inibidor PD 98059 antes da infecção houve uma queda na ativação de ERK1/2. Ainda, quando estas células foram transfectadas com os vetores dominantes negativos de Raf e Ras, e submetidas à invasão pelo parasito, verificou-se uma diminuição da ERK1/2 ativada, o que quer dizer que a ativação de ERK1/2 nestas células infectadas segue a via de Ras-Raf-ERK.

A via de sinalização de Ras também está envolvida no processo fagocítico dos macrófagos? Segundo Liu et al. (2006) células apoptóticas são rapidamente internalizadas por fagócitos para proteger os tecidos contra resíduos tóxicos provenientes de células mortas, sendo que uma variedade de sinais extracelulares estimulam os macrófagos a promover a fagocitose através da ativação de proteínas Ras, iniciando uma cascata de sinalização que contribui para a regulação do processo fagocítico. Estes pesquisadores estudando o processo de fagocitose de células apoptóticas por macrófagos, tratados com um inibidor de Ras chamado manumicina A, mostraram que as proteínas Ras estão associadas ao processo de fagocitose.

A proteína quinase Raf-1 é conhecida por interagir com a proteína Ras e iniciar a cascata de sinalização associada à fagocitose. ERK é uma MAPK que exerce um papel importante na modulação da fagocitose e faz parte da via de sinalização de Ras, a fosforilação de ERK também pode ser revertida pelo tratamento com os seguintes inibidores: inibidor de Ras (manumicina), inibidor de Raf-1 e o inibidor PD98095. É sabido que a fagocitose de partículas, células opsonizadas e *E. coli* é regulada por uma série de eventos moleculares que inclui a ativação da proteína quinase Ras, sendo que esta proteína ativada liga-se e ativa ao menos duas classes de proteínas, a Raf-1 quinase e a PI3K (LIU et al., 2006).

De acordo com Aderem e Underhill (1999) a fagocitose é um evento extremamente complexo e nenhum modelo simples pode dar conta das diversas estruturas e resultados associados com a internalização de partículas, tal complexidade é devida à diversidade de receptores capazes de estimular a fagocitose e em parte devido à capacidade de diversos micróbios de influenciar a maneira como são internalizadas. Ainda, o primeiro desafio do sistema imune inato é a discriminação de um grande número de patógenos usando um número limitado de receptores fagocíticos.

A importância da via de sinalização de mTOR na interação parasita-hospedeiro e também no processo fagocítico ainda não está muito esclarecida, nossos resultados mostram que esta via foi necessária durante a invasão de macrófagos por formas TCT. Segundo Maeda et al. (2012) a via de mTOR está ativada na invasão de formas tripomastigotas metacíclicas de

modo dependente de algumas glicoproteínas de superfície do parasita, como gp82 e a gp30, sendo está última relacionada à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e exocitose de lisossomos através da ativação da via PI3K/mTOR/PKC.

Também Romano et al. (2009), estudando a relação entre a via autofágica e a invasão de *T. cruzi*, induziu autofagia em células hospedeiras usando o inibidor de mTOR (Rapamicina) e mostrou que houve um aumento na internalização de formas TCT das cepas CL e RA de forma dependente dos lisossomos.

Diferentemente dos resultados de Romano et al. (2009), Martins et al. (2011) trabalhando com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* da cepa CL mostrou que a internalização destas formas pode até ter sido aumentada em condições de estresse nutricional e indução da via autofágica, mas é prejudicada quando as células hospedeiras são tratada com inibidor de mTOR (Rapamicina) em todas as concentrações testadas. Ainda, Martins et al. (2011) estendeu sua análise à cepa G do parasita, a qual é geneticamente divergente da cepa CL, e observou que tripomastigotas desta cepa tiveram sua internalização reduzida nas células hospedeiras tratadas com Rapamicina.

Também verificamos a ativação da via mTOR em macrófagos incubados com TCT mortos, ela também pode estar envolvida na maquinaria de fagocitose por macrófagos. Mas de que forma esta via se relaciona com o processo fagocítico? Segundo Fox et al. (2007) uma categoria de proteínas quinase associadas à Rho (ROCKS) são importantes para muitas funções fisiológicas, exercendo um papel crítico na regulação do processo de polimerização da actina, rearranjo do citoesqueleto, fagocitose mediada por receptores de complemento e quimiotaxia. Macrófagos provenientes de camundongos “*wild-type*” tratados com Rapamicina/Sirolimus ou com o inibidor de ROCK (Y27632) tiveram as funções de quimiotaxia e fagocitose bloqueada.

Ainda, Ganesan et al. (2004) estudando a p70S6, uma quinase que influencia o citoesqueleto de actina e a migração celular, constatou que a inibição da p70S6 quinase por Rapamicina influencia negativamente a fagocitose por um mecanismo que envolve a proteína quinase AKT, a p70S6 e o receptor de fagocitose Fcγ. Dessa forma, eles trataram macrófagos derivados de medula óssea e células e RAW 264.7 com Rapamicina e demonstraram a supressão da fagocitose confirmando o papel desta via no processo fagocítico.

Realizamos ensaios de fagocitose de partículas de zymosan por macrófagos tratados com os inibidores das vias de sinalização e comparamos com os resultados obtidos no estudo da sinalização celular ativada por parasitas mortos. A fagocitose de partículas de zymosan foi reduzida naquelas células tratadas com os inibidores de MEK1/2, Ras, mTOR e AKT, em

relação ao controle não tratado. Verificamos os mesmos resultados no caso dos TCT mortos, onde houve uma menor internalização de parasitas mortos nos macrófagos tratados com essas mesmas drogas.

Ainda, precisamos investigar minuciosamente a questão das proteínas de superfície de parasitas mortos pelo calor. Neste trabalho mostramos que a proteína recombinante P21 secretada pelo *T. cruzi* é capaz de recuperar sua estrutura secundária se for desnaturada por ureia ou pelo calor, desde que as condições de renovelamento e temperatura sejam adequadas. Então, as proteínas de superfície de *T. cruzi* mortos pelo calor resistiram ao aquecimento? Renovelaram após o resfriamento? Caso tenham renovelado foram capazes de ativar alguma via de sinalização nos macrófagos. Estas são questões que serão respondidas em trabalhos futuros.

## 7.0 CONCLUSÕES

Ambos os processos de purificação da proteína recombinante P21 descritos forneceram amostras biologicamente ativas. Segundo Singh e Panda (2005) altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* frequentemente resulta em acúmulo de agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão, os quais são desprovidos de qualquer atividade biológica e necessitam de solubilização, renovelamento e purificação para se converterem em uma proteína ativa, tal como ocorre com a P21-His<sub>6</sub>.

Por meio do protocolo de purificação e renovelamento da P21-His<sub>6</sub> obtivemos a proteína biologicamente ativa e na conformação correta, pois sua estrutura secundária é similar à proteína purificada a partir da fração solúvel do extrato bacteriano. O protocolo de renovelamento é simples de ser executado, requer menos gasto material, fornece maiores quantidades de proteína e não necessita de sofisticados equipamentos de purificação tais como o sistema AKTA purifier.

Independente do processo de purificação da P21-His<sub>6</sub>, a partir dos corpos de inclusão ou da fração solúvel do extrato bacteriano, a proteína obtida é capaz de estimular macrófagos peritoneais a aumentar o processo de fagocitose de partículas de zymosan por ativar a via de sinalização da PI3 quinase. Esta proteína também foi capaz de intensificar a quantidade de AE e TCT da cepa CL de *T. cruzi* internalizados em células não-fagocíticas por estimular o processo de invasão destes parasitas. Ainda, as proteínas obtidas a partir de protocolos de purificação distintos foram reconhecidas por anticorpos policlonais provenientes de animais imunizados contra a P21-His<sub>6</sub>.

Nos estudos de sinalização celular ativada em macrófagos peritoneais por formas AE e TCT de *T. cruzi*, nas situações em que os parasitas estavam vivos, mortos e opsonizados, verificamos que as formas AE e TCT dos parasitas opsonizados eram intensamente internalizados nos macrófagos, apesar destas células estarem sob efeito das drogas inibidoras das vias de transdução.

AE vivos ativaram as vias de PI3K e MAPKs e são internalizados em maior quantidade que AE mortos, os quais ativaram apenas as vias de MAPKs. TCT vivos e TCT mortos ativaram todas as vias de sinalização estudadas, as formas TCT apresentam moléculas de superfície distintas daquelas presentes nas formas AE, por isso as vias de transdução de sinais ativadas por estas formas foram, além de PI3K e MAPKs, as vias de nRAS e mTOR.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, p. 593-623, 1999.

ALIBOLANDI, M.; MIRZAHOSEINI, H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. **Biochemistry Research International**, v. 2011, n. 2011, p. 1-6, August 2011.

ALLEN, L. H.; ADEREM, A. A role for MARCKS, the  $\alpha$  isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. **J. Exp. Med**, v. 183, n. 3, p. 829-840, September 1995.

AMOS, S.; REDPATH, G. T.; POLAR, G.; MCPHESON, R.; SCHIFF, D.; HUSSAINI, I. M. Farnesylthiosalicylic acid induces caspase activation and apoptosis in glioblastoma cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 14, p. 642-651, April 2006.

AOKI, M. D. P.; CANO, R. C.; PELLEGRINI, A.V.; TANOS, T.; GUIÑAZÚ, N. L.; COSO, O. A.; GEA, S. Different signaling pathways are involved in cardiomyocyte survival induced by a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1723-1731, June 2006.

BALLOU, L. M.; LIN, R. Z. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. **Journal of Chemical Biology**, v. 1, n. 1-4, p. 27-36, November 2008.

BAMBINO-MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, F. O. R.; CALVET, C. M.; VICENTE, D.; TOMA, L.; KRIEGER, M. A.; MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C. S. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. **Parasitology**, v. 138, n. 5, p. 593-601, April 2011.

BAO, Y.; WEISS, L. M.; BRAUSTEIN, V. L.; HUANG, H. Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 10, p. 4757-4763, August 2008.

BARRIAS, E. S.; REIGNAULT, L. C.; SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. **Plos One**, v. 5, n. 1, p. 1-11, January 2010.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. **Journal of Infectious Disease**, v. 143, n. 3, p. 325-345, March 1981.

BHANDARI, D. R.; SEO, K. W.; ROH, K. H.; JUNG, J. W.; KANG, S. K.; KANG, K. S. REX-1 Expression and p38 MAPK activation status can determine

proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. **Plos One**, v. 5, n. 5, p. 1-10, May 2010.

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

CABEC, V. L.; EMORINE, L. J.; TOESCA, I.; COUGOULE, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 6, p. 934-943, June 2005.

Calbiochem 5-Iodotubercidin. Disponível em:

[http://search.cosmobio.co.jp/cosmo\\_search\\_p/search\\_gate2/docs/CBC\\_/407900.20040716.pdf](http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/CBC_/407900.20040716.pdf)  
>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Calbiochem Inhibitor Sourcebook. Disponível em:

[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protease\\_Inhibitors/CALBIOCHEM-Inhibitors.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protease_Inhibitors/CALBIOCHEM-Inhibitors.pdf)>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Calbiochem p38 MAP Kinase Inhibitor III. Disponível em:

[http://search.cosmobio.co.jp/cosmo\\_search\\_p/search\\_gate2/docs/CBC\\_/506121.20040716.pdf](http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/CBC_/506121.20040716.pdf)  
>. Acesso em: 08 fev. 2013.

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

CAMPER, M. V.; VIOLA, R. E. Fully automated protein purification. **Analytical Biochemistry**, v. 393, n. 2, p. 176-181, July 2009.

CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-479, August 2006.

Cayman Chemical Farnesyl Thiosalicylic Acid. Disponível em:

<https://www.caymanchem.com/pdfs/10010501.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Cayman Chemical Rapamycin. Disponível em:

<https://www.caymanchem.com/pdfs/13346.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Cell Signaling Technology LY294002 PI3 Kinase Inhibitor. Disponível em:

<http://www.cellsignal.com/pdf/9901.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Cell Signaling Technology PD98059 MEK1 Inhibitor. Disponível em:

<http://www.cellsignal.com/pdf/9900.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Cell Signaling Technology Rapamycin (FRAP/mTOR Inhibitor). Disponível em: <http://www.cellsignal.com/pdf/9904.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Cell Signaling Technology U0126 MEK1/2 Inhibitor. Disponível em: <http://www.cellsignal.com/pdf/9903.pdf>>. Acesso em: 08 fev. 2013.

CHOW, M. K. M.; AMIN, A. A.; FULTON, K. F.; FERNANDO, T.; KAMAU, L.; BATTY, C.; LOUCA, M.; HO, S.; WHISSTOCK, J. C.; BOTTOMLEY, S. P.; BUCKLE, A. M. The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. D207–D21, January 2006.

CHUENKOVA, M. V.; PERRIN, M. P. *Trypanosoma cruzi* targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy. **Science Signaling**, v. 2, n. 97, p. 1-20, April 2008.

D'AVILA, H.; TOLEDO, D. A. M.; MELO, R. C. N. Lipid bodies: inflammatory organelles implicated in host-*Trypanosoma cruzi* interplay during innate immune responses. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1-11, April 2012.

DUDLEY, D. T.; PANG, L.; DECKER, S. J.; BRIDGES, A. J.; SALTIEL, A. R. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, n. 17, p. 7686–7689, August 1995.

Enzo Life Sciences PD-98059 MEK inhibitor. Disponível em: [http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els\\_b62e86ab1d.pdf](http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_b62e86ab1d.pdf)>. Acesso em: 08 fev. 2013.

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

FERNANDES, A. B.; NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; MORTARA, R. A. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitology Research**, v. 100, n. 1, p. 59-68, June 2006.

FERREIRA, D.; CORTEZ, M.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5522-5528, October 2006.

FERREIRA, E. R.; BONFIM-MELO, A.; MORTARA, R. A.; BAHIA, D. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 363, p. 1-6, November 2012.



FLUCKIGER-ISLER, R.; WALTER, P. Stimulation of rat liver glycogen synthesis by the adenosine kinase inhibitor 5-iodotubercidin. **The Biochemical Journal**, v. 292, n. 1, p. 85-91, May 1993.

FOX, F.; NHAN, T. Q.; LAW, G. L.; MORRIS, D. R.; LILES, W. C.; SCHWARTZ, S. M. PSGL-1 and mTOR regulate translation of ROCK-1 and physiological functions of macrophages. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 2, p. 505-515, January 2007.

FOX, T.; COLL, J. T.; XIE, X.; FORD, P. J.; GERMANN, U. A.; PORTER, M. D.; PAZHANISAMY, S.; FLEMING, M. A.; GALULLO, V.; SU, M. S. S.; WILSON, K. P. A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase. **Protein Science**, v. 7, n. 11, p. 2249-2255, November 1998.

GANA-WEISZ, M.; WIENER, J. H.; JANSEN, B.; ELAD, G.; HAKLAI, R.; KLOOG, Y. The ras inhibitor s-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid chemosensitizes human tumor cells without causing resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 2, p. 555-565, February 2002.

GANESAN, L. P.; WEI, G.; PENGAL, R. A.; MOLDOVAN, L.; MOLDOVAN, N.; OSTROWSKI, M. C.; TRIDANDAPANI, S. The serine/threonine kinase Akt promotes Fc receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages through the activation of p70S6 kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54416-54425, December 2004.

GARCÍA-GARCÍA, E.; ROSALES, C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, n. 6, p. 1092-1108, December 2002.

GARRIDO, V. V.; DULGERIAN, L. R.; STEMPIN, C. C.; CERBÁN, F. M. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1257-1272, October 2011.

GAZI, U.; POMARES-MARTINEZ, L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. **Immunobiology**, v. 214, n. 7, p. 554-561, July 2009.

GONG, X.; MING, X.; DENG, P.; JIANG, Y. Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, n. 6, p. 1420-1429, August 2010.

GRAHAM, L. S.; PARHAMI, F.; TINTUT, Y.; KITCHEN, C. M. R.; DEMER, L. L.; EFFROS, R. B. Oxidized lipids enhance RANKL production by T lymphocytes: implications for lipid-induced bone loss. **Clinical Immunology**, v. 133, n. 2, p. 265-275, November 2009.

GUARBI, S. I.; ZVELEBIL, M. J.; SHUTLEWORTH, S. J.; HANCOX, T.; SAGHIR, N.; TIMMS, J. F.; WATERFIELD, M. D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 1, p. 15-21, May 2007.

HAKLAI, R.; WEISZ, M. G.; ELAD, G.; PAZ, A.; MARCIANO, D.; EGOZI, Y.; BARUCH, G. B.; KLOOG, Y. Dislodgment and accelerated degradation of ras. **Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1306-1314, February 1998.

HALL, M. N. mTOR – What does it do? **Transplantation Proceedings**, v. 40, n. 10, p. S5-S8, December 2008.

Invivogen LY294002 Phosphatidylinositol 3-kinase Inhibitor. Disponível em: [http://www.invivogen.com/PDF/Ly294002\\_TDS\\_10C22-MM.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/Ly294002_TDS_10C22-MM.pdf)>. Acesso em: 08 fev. 2013.

Invivogen PD98059 MAP Kinase Kinase (MAPKK) Inhibitor. Disponível em: [http://www.invivogen.com/PDF/PD98059\\_TDS.pdf](http://www.invivogen.com/PDF/PD98059_TDS.pdf)>. Acesso em: 08 fev. 2013.

JOINER, K.; SHER, A.; GAITHER, T.; HAMMER, C. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 17, p. 6593-6597, September 1986.

JOINER, K.; SHER, A.; GAITHER, T.; HAMMER, C. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 83, n. 17, p. 6593-6597, September 1986.

KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITS, R. A. B.; CODER, D.; ARUFFO, A.; FARR, A. The major surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2649-2656, July 1996.

KIM, K. S.; ABDELMEGEED, M. A.; NOVAK, R. F. The mitogen-activated protein kinase (MEK) inhibitor PD98059 elevates primary cultured rat hepatocyte glutathione levels independent of inhibiting MEK. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 4, p. 683-689, April 2006.

KIPNIS, T. L.; DAVID, J. R.; ALPER, C. A. ; SHER, A.; DA SILVA, W. D. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 78, n. 1, p. 602-605, January 1981.

KIPNIS, T. L.; DAVID, J. R.; ALPER, C. A.; SHER, A.; SILVA, W. D. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n.1, p. 602-605, January 1981.

KRAUSS, M.; HAUCKE, V. Shaping membranes for endocytosis. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology**, v. 161, p.45-66, February 2012.

KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **Journal of Immunology**, v. 128, n. 5, p. 2009-2012, May 1982.

LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. The challenge of Chagas' disease : has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 837-843, December 2010.

LIU, Y. Q.; YOU, S.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Roles of Ras and extracellular signal-regulated kinase-dependent I $\kappa$ B $\alpha$  degradation in oridonin-enhanced phagocytosis of apoptotic cells by human macrophage-like U937 cells. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 2, p. 260-268, February 2006.

LIU, Z.; MA, Y.; MOYER, M. P.; ZHANG, P.; SHI, C.; QIN, H. Involvement of the mannose receptor and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway of the microdomain of the integral membrane protein after enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 4, p. 1343-1350, April 2012.

MAEDA, F. Y.; CORTEZ, C.; YOSHIDA, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. 361, p. 1-7, November 2012.

MANQUE, P. M.; NEIRA, I.; ATAYDE, V. D.; CORDERO, E.; FERREIRA, A. T.; SILVEIRA, J. F.; RAMIREZ, M.; YOSHIDA, N. Cell adhesion and Ca<sup>+2</sup> signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1561-1565, March 2003.

MARTINS, R. M.; ALVES, R. M.; MACEDO, S.; YOSHIDA, N. Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 943-954, April 2011.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; ÉVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, September 2009.

MIDDELBERG, A. P. J. Preparative protein refolding. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 437-443, October 2002.

MOLL, C.; PERIS, P.; MORENO, A.; MUNOZ, J.; GUANABENS, N. Severe invalidating pain syndrome associated with benznidazole therapy for Chagas' disease. **Clinical Rheumatology**, v. 27, n. 2, p. 269-270, August 2007.

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

MOTT, A.; LENORMAND, G.; COSTALES, J.; FREDBERG, J. J.; BURLEIGH, B. A. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 218, n. 2, p. 315-322, February 2009.

MUKHERJEE, S.; HUANG, H.; PETKOVA, S. B.; ALBANESE, C.; PESTELL, R. G.; BRAUNSTEIN, V. L.; CHRIST, G. J.; WITTNER, M.; LISANTI, M. P.; BERMAN, J. W.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5274-5282, September 2004.

MURTA, S. M. F; GAZZINELLI, R. T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 203-214, June 1998.

NAKAYASU, E. S.; GAYNOR, M. R.; SOBREIRA, T. J. P.; ROSS, J. A.; ALMEIDA, I. C. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. **Proteomics**, v.9, n. 13, p. 3489–3506, July 2009.

NAMURA, S.; LIHARA, K.; TAKAMI, S.; NAGATA, I.; KIKUCHI, H.; MATSUSHITA, K.; MOSKOWITZ, M. A.; BONVENTRE, J. V.; ALESSANDRINI, A. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11569–11574, September 2001.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n.4, p. 405-414, April 2002.

NEVO, Y.; MIZRACHI, S. A.; ELMAKAYES, E.; YANAY, N.; ETTINGER, K.; ELBAZ, M.; BRUNSCHWIG, Z.; DADUSH, O.; SFADIA, G. E.; HAKLAI, R.; KLOOG, Y.; CHAPMAN, J.; REIF, S. The ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), decreases fibrosis and improves muscle strength in  $dy^{2J}/dy^{2J}$  mouse model of muscular dystrophy. **Plos One**, v. 6, n. 3, p. 1-9, March 2011.

PARKINSON, F. E.; GEIGER, J. D.; Effects of iodotubercidin on adenosine kinase activity and nucleoside transport in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n. 3, p. 1397-1401, February 1996.

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

RAGHAVA, S.; BARUA, B.; SINGH, P. K.; DAS, M.; MADAN, L.; BHATTACHARYYA, S.; BAJAJ, K.; GOPAL, B.; VARADARAJAN, R.; GUPTA, M. N. Refolding and simultaneous purification by three-phase partitioning of recombinant proteins from inclusion bodies. **Protein Science**, v. 17, n. 11, p. 1987-1997, November 2008.

RAJARAM, M. V. S.; GANESA, L. P.; PARSA, K. V. L.; BUTCHAR,, J. P.; GUNN, J. S.; TRIDANDAPANI, S. Akt/protein kinase B modulates macrophage inflammatory response to *Francisella* infection and confers a survival advantage in mice. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 6317-6324, November 2006.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, R. C.; ARAYA, J. E.; SILVEIRA, J. F.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3636-3641, September 1993.

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE, T. M.; SANTOS, M. A.; MACHADO, F. C.; GOMES, R. G. B.; MOREIRA, H. H. T.; CRUZ, M. C.; BRÍGIDO, P. C.; SANTOS, P. C. F.; MARTINS F. A.; BAHIA, D.; MARICATO, J. T.; JANINI, L. M. R.; REBOREDO, E. H.; MORTARA, R. A.; SILVA, C. V. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. **Plos One**, v. 7, n. 12, p. 1-9, December 2012.

ROMANO, P. S.; ARBOIT, M. A.; VÁZQUEZ, C. L.; COLOMBO, M. I. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cel. **Autophagy**, v. 5, n. 1, p. 6-18, January 2009.

RUIZ, R. C.; FAVORETO, S. JR.; DORTA, M. L.; OSHIRO, M. E.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M.; YOSHIDA, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* isolates is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signaling activity. **Biochemical Journal**, v. 330, n. 1, p. 505-511, February 1998.

RUNCHEL, C.; MATSUZAWA, A.; ICHIJO, H. Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 1, p. 1-14, July 2011.

SÁNCHEZ-MAJORADA, G.; ROSALES, C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 63, n. 5, p. 521-533, May 1998.

SANTOS, C. R.; FESSEL, M. R.; VIEIRA, L. C.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; GUIMARÃES, B. G.; ZANCHIN, N. I. T.; RIBEIRO, J. A.; BARBOSA, G. Crystallization and preliminary X-ray diffraction Analysis of Q4DV70 from *Trypanosoma cruzi*, a hypothetical protein with a putative thioredoxin domain. **Acta Crystallographica**, v. 65, n. 6, p. 641-644, June 2009.

SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, suppl. 1, p. 51-63, August 1999.

SCHENKMAN, S.; GUTHER, M. L.; YOSHIDA, N. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. **Journal of Immunology**, v. 137, n. 5, p. 1623-1628, September 1986.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas' disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583-588, December 2006.

SCHOIJET, A. C.; MIRANDA, K.; GIRARD-DIAS, W.; SOUZA, W.; FLAWIÁ, M. M.; TORRES, H. N.; DOCAMPO, R.; ALONSO, G. D. A *Trypanosoma cruzi* phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) is involved in osmoregulation and receptor-mediated endocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 46, p. 31541-31550, November 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C. P.; NETO, V. A.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JR, E. R.; LOPES, M. H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 5, p. 351-357, October 1991.

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIONVANNA, B.; CRUZ, M. C.; DA SILVA, E. A.; SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M. R. S.; ANDREWS, N. W.; MORTARA, R. A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 563-570, April 2009.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, April 2005.

SMULSKI, C. R.; LONGHI, S. A.; AYUB, M. J.; EDREIRA, M. M.; SIMONETTI, L.; GÓMEZ, K. A.; BASILE, J. N.; CHALOIN, O.; HOEBEKE, J.; LEVIN, M. J. Interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex (stalk) and the elongation factor 2. **Molecular Recognition**, v. 24, n. 2, p. 359-370, March-April 2010.

SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, n. 2010, p. 1-18, July 2010.

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 11, p. 2926-2931, June 2010.

TODOROV, A. G.; EINICKER-LAMAS, M.; CASTRO, S. L.; OLIVEIRA, M. M.; GUILHERME, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 32182-32186, October 2000.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; DUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression & Purification**, v. 28, n. 1, p. 1-8, March 2003.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 3, n. 11, p. 1-12, September 2004.

VEERDONK, F. L. V.; MARIJNISSEN, R. J.; KULLBERG, B. J.; KOENEN, H. J. P. M.; CHENG, S. C.; JOOSTEN, I.; BERG, W. B. V. D.; WILLIAMS, D. L.; MEER, J. W. M. V. D.; JOOSTEN, L. A. B.; NETEA, M. G. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 329-340, April 2009.

VIEIRA, M. C. F.; CARVALHO, T. U.; SOUZA, W. Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 2, p. 967-971, September 1994.

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; JR. B. J. M.; LIMA, M. F. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, n. 1, p. 247-252, August 1998.

WANG, X. T.; ENGEL, P. C. An optimised system for refolding of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. **BMC Biotechnology**, v. 9, n. 19, p. 1-10, March 2009.

WILKOWSKY, S. E.; BARBIERI, M. A.; STAHL, P.; ISOLA, E. L. D. *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. **Experimental Cell Research**, v. 264, n. 2, p. 211-218, April 2001.

WILLIS, M. S.; HOGAN, J. K.; PRABHAKAR, P.; LIU, X.; TSAI, K.; WEI, Y.; FOX, T. Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: A study of reagent effects and interactions. **Protein Science**, v. 14, n. 7, p. 1818-1826, July 2005.

WOOLSEY, A. M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C. A.; BRACHMANN, S. M.; CANTLEY, L. C.; BURLEIGH, B. A. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of *Trypanosoma* invasion and vacuole maturation. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 17, p. 3611-3622, September 2003.

YANG, S. J.; CHANG, S. C.; WEN, H. C.; CHEN, C. Y.; LIAO, J. F.; CHANG, C. H. Plumbagin activates ERK1/2 and Akt via superoxide, Src and PI3-kinase in 3T3-L1 Cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 638, n. 1-3, p. 21-28, July 2010.

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

YOSHIDA, N.; MORTARA, R. A.; ARAGUTH, M. F.; GONZÁLEZ, J.; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-Kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 6, p. 1663-1667, June 1989.



## ANEXO A – Artigo Publicado na Revista Plos One

OPEN ACCESS Freely available online



## A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis

Adele A. Rodrigues<sup>1,3</sup>, Tatiana M. Clemente<sup>1,3</sup>, Marlus A. dos Santos<sup>1,3</sup>, Fabrício C. Machado<sup>1,3</sup>, Rafael G. B. Gomes<sup>1,3</sup>, Heline Hellen T. Moreira<sup>3</sup>, Mário C. Cruz<sup>2</sup>, Paula C. Brígido<sup>1</sup>, Paulo C. F. dos Santos<sup>1</sup>, Flávia A. Martins<sup>1</sup>, Diana Bahia<sup>2</sup>, Juliana T. Maricato<sup>2</sup>, Luiz M. R. Janini<sup>2</sup>, Eduardo H. Reboredo<sup>3</sup>, Renato A. Mortara<sup>2</sup>, Claudio V. da Silva<sup>1\*</sup>

**1** Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil, **2** Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brazil

### Abstract

**Background:** P21 is a secreted protein expressed in all developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. The aim of this study was to determine the effect of the recombinant protein based on P21 (P21-His<sub>6</sub>) on inflammatory macrophages during phagocytosis.

**Findings:** Our results showed that P21-His<sub>6</sub> acts as a phagocytosis inducer by binding to CXCR4 chemokine receptor and activating actin polymerization in a way dependent on the PI3-kinase signaling pathway.

**Conclusions:** Thus, our results shed light on the notion that native P21 is a component related to *T. cruzi* evasion from the immune response and that CXCR4 may be involved in phagocytosis. P21-His<sub>6</sub> represents an important experimental control tool to study phagocytosis signaling pathways of different intracellular parasites and particles.

**Citation:** Rodrigues AA, Clemente TM, dos Santos MA, Machado FC, Gomes RGB, et al. (2012) A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. PLoS ONE 7(12): e51384. doi:10.1371/journal.pone.0051384

**Editor:** Joy Sturtevant, Louisiana State University, United States of America

**Received:** April 12, 2012; **Accepted:** November 6, 2012; **Published:** December 10, 2012

**Copyright:** © 2012 Rodrigues et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Process number: APQ-00621-11), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Process number: 23038005295/2011-40) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: silva\_cv@yahoo.com.br

☞ These authors contributed equally to this work.

**ANEXO B – Artigo Submetido à Revista Molecular & Biochemical Parasitology**

Elsevier Editorial System(tm) for Molecular & Biochemical Parasitology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Refolded and soluble P21-His6, a recombinant protein based on Trypanosoma cruzi P21, showed similar biophysical properties.

Article Type: Research Paper

Keywords: Trypanosoma cruzi; inclusion bodies; protein refolding; P21-His6

Corresponding Author: Prof. Claudio Vieira da Silva, PhD

Corresponding Author's Institution: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

First Author: Marlus A dos Santos

Order of Authors: Marlus A dos Santos; Heline H T Moreira; Francesco B Teixeira; Adele A Rodrigues; Fabrício C Machado; Rafael Gonçalves B Gomes; Flavia A Martins; Paula C Brígido; Rebecca T Silva; Diana Bahia; Renato A Mortara; Claudia E Munte; Eduardo Horjales; Claudio Vieira da Silva, PhD

Abstract: P21-His6 is a recombinant protein based on the native P21 from Trypanosoma cruzi that is involved in mammalian cell invasion. During our attempts to purify the recombinant protein from Escherichia coli extracts, we always had an abundant expression in inclusion bodies compared to the soluble extract fraction. Therefore, we aimed to verify the physical and biological features of the soluble protein (sP21-His6) comparing to the refolded one (rP21-His6). Our results indicated that the refolded protein shared similar biological and physical characteristics compared to the soluble protein. Thus, the refolded protocol may be considered an important source of recombinant P21 to be used in experimental approaches.

Suggested Reviewers: Santuza Teixeira  
santuzat@ich.ufmg.br

Maria Carolina Elias  
carol@butantan.gov.br

Angela Cruz  
akcruz@fmrp.usp.br