

Leonardo Freire de Lima

“Mecanismos moleculares que contribuem para que
a *trans*-sialidase do *Trypanosoma cruzi* atue
como um fator de virulência na infecção
chagásica experimental”

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mecanismos moleculares que contribuem para que a *trans*-sialidase o *Trypanosoma cruzi* atue como um fator de virulência na infecção chagásica experimental

Leonardo Freire de Lima

Orientador: Dra. Lucia Mendonça Previato

2º Orientador: Dra. Adriane Regina Todeschini

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Banca Examinadora:

Dra. Lucia Mendonça Previato
Professor Titular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ
Orientador

Dr. Pedro Muanis Persechini
Professor Titular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ
Presidente

Dr. Julio Scharfstein
Professor Titular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ

Dr. Roger Chammas
Professor Adjunto, Faculdade de Medicina – USP

Dra. Ana Paula Cabral de Araújo Lima
Professora Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ
Revisor e Suplente

Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani
Pesquisadora Titular, Fundação Oswaldo Cruz – IOC
Suplente Externo

Rio de Janeiro
Julho de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Freire de Lima, L

Mecanismos Moleculares que contribuem para que a *trans*-sialidase do *Trypanosoma cruzi* atue como um fator de virulência na infecção chagásica experimental. Rio de janeiro, UFRJ, IBCCF, 2008.

xvi, 105 f.

Tese: Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)

1. *trans*-sialidase 2. *Trypanosoma cruzi* 3. ácido siálico 4. linfócitos T

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Glicobiologia do Programa de Parasitologia e Biologia Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação das professoras Lucia Mendonça Previato e Adriane Regina Todeschini na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Dedico...

Esta tese a minha amada esposa Patrícia, que ao longo desses anos vem me apoiando em tudo o que faço. Muito obrigado pela sua atenção, compreensão, dedicação, paciência e amor. Sem você ao meu lado, eu não conseguiria chegar até aqui. Você é a pessoa mais especial da minha vida. Te amo Paty!

A minha mãe Lenice e ao meu pai Francisco, que foram as pessoas que me educaram, me deram força e sempre acreditaram na minha vitória. Se eu adquiri durante nossa convivência a metade do caráter de vocês, eu já me sinto muito satisfeito. Vocês são muito especiais na minha vida. Amo muito vocês!

A minha avó Maria Conceição, pelo amor e carinho. Apesar dos seus 88 anos, demonstra muita alegria e vontade de viver quando estamos juntos. Te amo vó!

Aos meus irmãos Marco e Célio, pela colaboração, apoio e amizade durante todos esses anos. Nunca esquecerei o que fizeram por mim. Serei sempre grato a vocês!

Agradeço...

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me dado a oportunidade de trabalhar ao lado de profissionais tão qualificados.

Agradeço a Lucia Mendonça Previato, pela valiosa orientação, carinho e apoio durante nossa convivência. Apesar de ser uma excelente orientadora, é uma grande mãe para todos os alunos que fazem parte do laboratório de Glicobiologia. Nunca esquecerei os seus ensinamentos. Serei sempre grato a você.

A Adriane Regina Todeschini pela excepcional orientação. Adorei trabalhar com você durante o meu doutorado. Sempre disposta a discutir e ajudar em todas as ocasiões. Gostaria muito de voltar a trabalhar contigo no futuro. Você foi uma orientadora nota 10. A *trans*-sialidase me deu muita dor de cabeça, mas valeu muito a pena ser orientado por você. Muito obrigado por tudo.

Ao professor José Osvaldo Previato, por todo apoio. Depois dos sete anos que passei no laboratório de Glicobiologia, posso dizer com toda a certeza, que fica muito fácil trabalhar ao lado de quem sabe. Obrigado pelos valiosos ensinamentos.

Ao amigo Frederico Alisson, pela ajuda constante e pelos altos papos na varanda do laboratório. Após cada experimento, sempre tentando achar uma boa explicação para o resultado obtido. Acho que fizemos uma boa dupla. Ninguém faz nada sozinho. Sem você, esta tese não seria finalizada. Valeu meu irmão.

A professora Christina Takiya, pela enorme ajuda e orientação durante as análises imunohistoquímicas e histopatológicas. Muito obrigado.

A doutora Andréa Henrique-Pons da Fiocruz, por toda ajuda ao longo do projeto.

Aos professores do laboratório de Biologia Imunitária, Marise e George dos Reis, pela ajuda e colaboração durante o desenvolvimento desta tese.

Ao professor Maurício Martins Rodrigues, por me acolher em seu laboratório e me ajudar nas etapas finais da tese.

A Fanny Tzelepis, pela ajuda nos ensaios de citotoxicidade.

A Miriam Maria, pela ajuda durante as análises realizadas por real time PCR.

Ao Victor Saraiva, pela ajuda em muitos experimentos realizados. Obrigado pelo companheirismo e amizade. Sei que é um cara que sempre poderei contar.

Ao Sebastião, pela alegria e descontração no laboratório. Posso dizer, que esse cara é uma figura folclórica do CCS. Obrigado pela ajuda meu amigo.

Ao Orlando Agrellos, pela ajuda, amizade e apoio durante todos esses anos no laboratório.

Ao professor Norton Heise, com quem iniciei minha pós-graduação no laboratório de glicobiologia. Valeu pelos ensinamentos. Serei sempre grato a você.

Aos meus sobrinhos Matheus e Juliana, pela alegria e amizade.

As minhas cunhadas Débora e Cleuza, pelo apoio e companheirismo durante todos esses anos.

Aos meus tios Romilda, Geraldo *in memoriam*, Rosa e Jorge, por sempre acreditarem em mim e por fazerem parte da minha vida. Muito obrigado!

Aos meus sogros Rosa e Jorge, pela confiança e carinho durante esses dez anos de convivência. Vocês são muito especiais para mim.

Aos demais amigos do laboratório de Glicobiologia: Gilberto, Maurício, Daniel (só osso), Daniel (barriga), Letícia Hallack, Lana Cristina, Suellen, Iara, Vinícius, Renata, Diego, Ana Acácia, Wagner, Juliana, Carolina e Kelly, pela amizade e incentivo. Valeu galera!

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* possui em sua superfície proteínas pertencentes à família das *trans*-sialidases (TS). Alguns membros dessa família são enzimaticamente ativos (TSa), sendo capazes de hidrolisar ou preferencialmente transferir unidades de α 2-3- ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro para moléculas do tipo mucina presentes na superfície do parasita, enquanto membros enzimaticamente inativos (TSi) apresentam apenas propriedades lectínicas. A TSa tem sido implicada na patogênese da doença de Chagas, uma vez que sua administração em camundongos não infectados é capaz de induzir eventos característicos da fase aguda da doença de Chagas, além de aumentar a parasitemia e proporções de mortalidade em camundongos infectados. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis por estes fenômenos ainda são objetos de estudo. Neste trabalho, nós estudamos os efeitos da TSi e TSa durante a infecção pelo *T. cruzi*. Em concordância com o aumento da parasitemia, nós observamos um aumento do número de ninhos de amastigota e da concentração de DNA parasitário no tecido cardíaco de camundongos infectados e tratados com TSa (ITSa), quando comparado aos camundongos infectados e tratados com TSi (ITSi) ou camundongos infectados e tratados com PBS (INF). Todavia, quando a TSi foi co-injetada com a TSa, os efeitos biológicos desencadeados pela atividade enzimática foram abolidos, confirmando que a atividade enzimática desempenhada por proteínas pertencentes a família TS atuam como um fator de virulência durante a infecção pelo *T. cruzi*. Análises realizadas por citometria de fluxo e imunohistoquímica mostraram uma redução no número de ambas as populações de células T no tecido cardíaco de camundongos ITSi. Em concordância, houve uma redução significativa da atividade creatina cinase no soro dos camundongos deste grupo. Nenhuma diferença foi observada nesses quesitos entre camundongos INF e ITSa. Esses resultados indicam que, embora TSi e TSa apresentem sítios conservados de ligação para α 2-3- ácido siálico e β Galp, essas moléculas podem desempenhar funções distintas durante a patogênese da doença de Chagas experimental.

Durante a ativação das células T, os clones sofrem uma remodelagem de superfície celular e suas glicoproteínas passam a apresentar-se livres de ácido siálico, tornando-se PNA^{high}. Entretanto, durante nossos experimentos foi observado que células T CD8⁺ de camundongos ITSa tornam-se PNA^{low}, glicofenótipo típico de células T não ativadas. Aqui, nós demonstramos pela primeira vez, que esse evento de re-sialilação bloqueia interações intermoleculares entre células alvo e células T efectoras *in vitro* e *in vivo*, comprometendo respostas imunes mediadas por células T CD8⁺ durante a infecção pelo *T. cruzi*. De maneira interessante, células T CD8⁺ de camundongos ITSi apresentaram alta positividade para PNA, indicando que a TSi poderia competir *in vivo* com a TSa nativa do parasita. Com base nesses resultados, propomos que esse evento natural de re-sialilação que ocorre durante a fase aguda da doença de Chagas possa ser um importante mecanismo de evasão desenvolvido pelo *T. cruzi* para mascarar respostas imunes específicas do hospedeiro e assegurar a sobrevivência do parasita no indivíduo infectado.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi possesses cell surface proteins belonging to *trans*-sialidase (TS) family. Some members of this family are enzymatically active (aTS), being able to hydrolyze or to preferentially to transfer α 2-3-linked sialic acids from host glycoconjugates to mucin-like molecules present in the parasite surface, while enzymatically inactive (iTTS) members present only lectinic properties. aTS has been implicated in the pathogenesis of Chagas disease because its administration to non-infected mice induces events that characterize the acute phase of Chagas disease, in addition to increasing parasitemia and the mortality of infected mice. However, the possible molecular mechanisms responsible for these phenomena are not elucidated. Here, we studied the effect of the administration of iTTS and aTS during *T. cruzi* infection. In agreement with the increase in parasitemia, we observed an increase in the number of amastigote nests and parasite DNA in the cardiac tissue from infected mice treated with aTS (IaTS) when compared with infected mice treated with iTTS (IiTTS) or infected mice treated with PBS (INF). Moreover, when iTTS was co-injected with aTS, the biological effects displayed by the active enzyme were abrogated, confirming that the enzymatic activity displayed by TS proteins acts as a virulence factor during *T. cruzi* infection. Analyses by flow cytometry and immunohistochemistry showed a reduction in the number of both T cell subsets in the cardiac tissue from IiTTS group. In agreement, there was a significant reduction in creatine kinase activity in the sera of this group. No difference was observed in these queries between INF and IaTS groups. These results indicate that, although TS proteins share conserved sugar binding sites, these molecules might play distinct roles during the pathogenesis of experimental Chagas disease.

During T cell activation, T cell clones undergo cell surface remodeling and present sialic acid-free glycoproteins at the surface, becoming PNA^{high}. However, in ours experiments, we observed that activated CD8⁺ T cells from IaTS mice become PNA^{low}, a glycophenotype found in resting T cells. Here, we demonstrated for the first time that this re-sialylation event blocks intermolecular interactions between target cells and effector CD8⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*, compromising immune responses displayed by antigen specific CD8⁺ T cells during *T. cruzi* infection. Interestingly, CD8⁺ T cells from *T. cruzi*-infected mice treated with iTTS presented high staining to PNA, indicating that iTTS could compete *in vivo* with native aTS. We postulate that the re-sialylation event that happens during the acute phase of Chagas disease can be an important evasion mechanism developed by *T. cruzi* to attenuate specific immune responses to ensure parasite survival in the infected host.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. O <i>T. cruzi</i> e a doença de Chagas	1
1.2. Glicobiologia da superfície do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.3. A <i>trans</i> -sialidase e o ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	9
1.4. Imuno-regulação por moléculas do <i>T. cruzi</i> durante a infecção chagásica	10
1.5. Biossíntese de cadeias <i>N</i> -ligadas em mamíferos	14
1.6. Biossíntese de cadeias <i>O</i> -ligadas em mamíferos	18
1.7. Sialiltransferases e linfócitos T	20
1.8. Resposta mediada por células T CD8 ⁺	24
1.9. Papel das células T CD8 ⁺ na doença de Chagas	27
2. Objetivos	32
3. Materiais e Métodos	33
3.1. Camundongos	33
3.2. Parasitas e Infecção	33
3.3. Obtenção da forma ativa (TSa) e inativa (TSi) da <i>trans</i> -sialidase	33
3.4. Tratamento de camundongos com TSa e TSi	34
3.5. Ensaio da atividade <i>trans</i> -sialidásica no plasma de camundongos Balb/c	35
3.6. Coleta e marcação de linfócitos para citometria de fluxo	35
3.7. Histopatologia	37
3.8. Imunohistoquímica	37
3.9. Parasitemia e mortalidade	38
3.10. Bioquímica sérica	38
3.11. PCR em tempo Real	39
3.12. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	41

3.13. Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i> -----	42
3.14. Elisa para detecção de IL-4 e INF- γ em culturas de células T esplênicas-----	43
4. Resultados -----	45
4.1. SDS-PAGE da TSa e TSi recombinante -----	45
4.2. Efeitos da TSa e TSi na parasitemia e sobrevida de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> -----	46
4.3. Efeitos da TSi e TSa na carga parasitária do tecido cardíaco de camundongos infectados pelo <i>T. cruzi</i> -----	50
4.4. Avaliação dos efeitos da TSa e TSi no tráfego de células T <i>in vivo</i> -----	52
4.5. Efeito da TSi e TSa no dano de fibras cardíacas em camundongos infectados-----	55
4.6. Avaliação dos efeitos pró-apoptóticos da TSa em células T de camundongos deficientes para o ligante de FAS (FASL ^{-/-})-----	57
4.7. Células T CD8 ⁺ de camundongos infectados e tratados com TSa apresentam um glicofenótipo PNA ^{low} -----	60
4.8. A TS nativa do <i>T. cruzi</i> re-sialila glicomoléculas de superfície celular em células T CD8 ⁺ ativadas durante a infecção chagásica experimental-----	64
4.9. A re-sialilação de células T CD8 ⁺ compromete a atividade citotóxica <i>in vitro</i> -----	66
4.10. A TS nativa do <i>T. cruzi</i> re-sialila células T CD8 ⁺ <i>in vivo</i> e compromete sua atividade citotóxica-----	68
5. Discussão -----	71
6. Referências -----	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	3
Figura 02: Representação esquemática da distribuição das principais moléculas de superfície do <i>T. cruzi</i> -----	5
Figura 03: Esquema representativo das reações catalisadas pela TSa do <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	7
Figura 04: Representação esquemática da estrutura protéica da <i>trans</i> -sialidas-----	8
Figura 05: Esquema representativo da biossíntese de cadeias <i>N</i> -ligadas em mamíferos -----	17
Figura 06: Esquema representativo da biossíntese de cadeias <i>O</i> -ligadas em mamíferos-----	19
Figura 07: SDS-PAGE da TSa do <i>T. cruzi</i> -----	45
Figura 08: TSa e não a TSi aumenta a virulência do <i>T. cruzi</i> em camundongos Balb/c infectados-----	48
Figura 09: A TSi reverte os efeitos induzidos pela TSa -----	49
Figura 10: Camundongos infectados e tratados com TSa apresentam um aumento no número de ninhinhos de amastigota por área e maior concentração de DNA do <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco-----	51
Figura 11: A TSi compromete o tráfego de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ para o tecido cardíaco de camundongos infectados-----	53
Figura 12: Camundongos ITS _i apresentam uma redução do número absoluto de células T infiltrantes no tecido cardíaco-----	54
Figura 13: Camundongos Balb/c infectados apresentam uma diminuição da atividade plasmática da CK após o tratamento com TSi-----	56

Figura 14: TSi e TSa não alteram a percentagem de células T esplênicas em camundongos normais e infectados -----	58
Figura 15: TSa induz a apoptose de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ esplênicas em camundongos Balb/c selvagens, mas não em animais deficientes para o ligante de FAS -----	59
Figura 16: Glicomoléculas em linfócitos T CD8 ⁺ ativados de camundongos ITSa apresentam um glicofenótipo PNA ^{low} -----	62
Figura 17: A TSa re-sialila células T CD8 ⁺ ativadas durante a infecção pelo <i>T. cruzi</i> -----	63
Figura 18: Quantificação da atividade <i>trans</i> -sialidásica no soro de camundongos normais e infectados com o <i>T. cruzi</i> -----	65
Figura 19: Células T CD8 ⁺ antígeno específicas re-sialiladas <i>in vitro</i> apresentam atividade citotóxica reduzida -----	67
Figura 20: Células T CD8 ⁺ de camundongos ITSa apresentam atividade citotóxica reduzida-----	70
Figura 21: Esquema representativo dos estágios de maturação de ambas as populações de células T, definidas por mudanças na expressão dos co-receptores CD4 ⁺ e CD8 ⁺ e pela sensibilidade a marcação com PNA-----	78

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – *antigen presenting cells*
 μL – microlitro
 μM – micromolar
AS – ácido siálico
ASP -1 – *antigen surface protein 1*
CD – *cluster of differentiation*
CRD – *carbohydrate recognition domain*
DN – duplo negativo
E. coli – *Escherichia coli*
FAS – receptor de morte
FASL – ligante de FAS
Gal – D-galactose
Galf – galactofuranose
GalNac – N-acetil-D-galactosamina
Galp – galactopirranose
GIPLs – glicoinositolfosfolipídeos
Glc – glucose
GlcNAc – N-acetilglucosamina
GPI – glicosil fosfatidil inositol
His – histidina
ICAM – *intracellular adhesion molecule*
INF – infectado
IPTG – isopropiltiogalactosídeo
ITSa – Infectado tratado com TSa
ITSi – infectado tratado com TSi
kDa – quilodaltons
LFA – *lymphocyte function-associated antigen*
LPPG – lipopeptídeofosfoglicana
MAA – *Maackia amurensis*
Man – manose
MHC – *major histocompatibility complex*
OST – oligossacaridiltransferase

OVA – ovalbumina
PAHO – *Pan American Health Organization*
PBS – tampão fosfato em solução salina
PCR – Polymerase Chain Reaction
PKC – proteína kinase C
PNA – *peanut agglutinin*
RCA – ricina
SAPA – antígeno liberado na fase aguda (Shed acute phase antigen)
SCID – camundongos imunodeficientes
SDS – dodecil sulfato de sódio
SLe^X – Sialil Lewis X
SNA – *Sambucus nigra agglutinin*
SP – simples positivo
ST – sialiltransferase
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*
TCM – células de memória central
TCR – receptor de célula T
TEM – células de memória efetora
Th – T helper
TNF – *tumoral necrosis factor*
TS – *trans*-sialidase
TSa – *trans*-sialidase ativa
TSi – *trans*-sialidase inativa
TSA-1 – *trypomastigotes surface antigen 1*
Tyr – tirosina

“No esforço para entender a realidade, agimos como um homem que tenta entender o mecanismo de um relógio fechado. Ele vê o mostrador e os ponteiros, mas não tem como abrir a caixa. Sendo habilidoso, pode imaginar o mecanismo responsável pelo que ele observa, mas nunca estará seguro de que sua explicação é a única possível”.

Albert Einstein

1. Introdução

1.1. O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descoberta no início do século 20 pelo Dr. Carlos Justiniano das Chagas, no interior de Minas. Em poucas semanas de trabalho, o doutor Chagas descobriu a doença, o mecanismo de transmissão e identificou o agente etiológico, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (revisto por Brener, 1973). Este parasita pertence à ordem Kinetoplastida e à família Tripanosomatidae (revisto por Brener, 1973). A infecção pelo *T. cruzi* é transmitida por diferentes espécies de insetos hematófagos pertencentes à família Reduviidae e subfamília Triatominae (revisto por De Souza, 2002). A transmissão também pode ocorrer por transplantes de órgãos (Phan *et al.*, 2006), transfusão de sangue (Dood *et al.*, 2002), por transmissão congênita (Punukollu *et al.*, 2007), transmissão oral (Cardoso *et al.*, 2006; Coura, 2006; Yoshida, 2008) ou de forma acidental em laboratório (Prata, 1994). A infecção é endêmica em dezoito países do continente americano. Entretanto, no final da década de 90, grandes avanços foram obtidos a partir da redução da transmissão vetorial e transfusional, particularmente no cone Sul (Massad, 2007). No dia 9 de junho de 2006, a Organização Pan Americana de Saúde (PAHO) presenteou o Ministério de Saúde do Brasil com um certificado internacional, devido à significativa redução da transmissão vetorial da doença de Chagas no país (Massad, 2007). Apesar disso, a infecção aflige pelo menos 15 milhões de indivíduos, acarretando grande impacto econômico e social, sendo ainda considerada importante problema de saúde pública (Moncayo, 2003).

A infecção pelo *T. cruzi* ocorre, principalmente, por via vetorial. Durante o repasto sanguíneo, o hospedeiro invertebrado elimina, nas fezes e urina, as formas tripomastigotas metacíclicas altamente infecciosas, que podem invadir praticamente

qualquer tipo de célula nucleada (Fig. 1) (Revisto por Tyler & Engman, 2001). Os tripomastigotas metacíclicos invadem as células de mamíferos por um processo complexo, provavelmente, iniciado pela interação de moléculas de superfícies do parasito e da célula do hospedeiro. O processo de sinalização recíproca resulta na formação de um vacúolo na célula hospedeira, contendo os parasitos. O vacúolo funde-se com lisossomos, dando origem ao vacúolo parasitóforo (Andrews, 1994; Andrews, 2002; Andrade & Andrews, 2005).

É proposto que devido à acidificação do vacúolo parasitóforo, uma proteína do tipo porina, produzida pelas formas tripomastigotas, auxilia o rompimento deste vacúolo, facilitando o escape dos tripomastigotas para o citoplasma. No citoplasma, os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas, um estágio replicativo intracelular encontrado exclusivamente no hospedeiro mamífero. Após vários ciclos de divisão, os amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas, que rompem a célula hospedeira, podendo atingir a corrente sanguínea e alcançar novos sítios de infecção ou serem ingeridas pelo inseto vetor durante seu repasto (Fig. 1) (Hoare Tyler & Engman, 2001).

Inicialmente, a infecção pela forma tripomastigota do *T. cruzi* resulta em uma fase aguda, cuja duração é de poucas semanas e caracteriza-se por alta parasitemia. Após esse período, segue-se uma fase “indeterminada” relativamente longa e assintomática. A doença torna-se clinicamente evidente décadas após a infecção inicial, afetando 30-40% dos indivíduos infectados, os quais poderão apresentar lesões irreversíveis em órgãos do sistema nervoso periférico, digestivo e principalmente o coração, sendo evidenciados sinais clínicos como cardite progressiva em cerca de 45% dos casos e, megaesôfago e megacólon em 11% e 3% dos casos, respectivamente (Andrade, 1991). Os indivíduos que não desenvolvem sintomas são uma ameaça aos bancos de sangue, pois podem transmitir a doença a partir da doação de sangue contaminado (Prata, 1994).

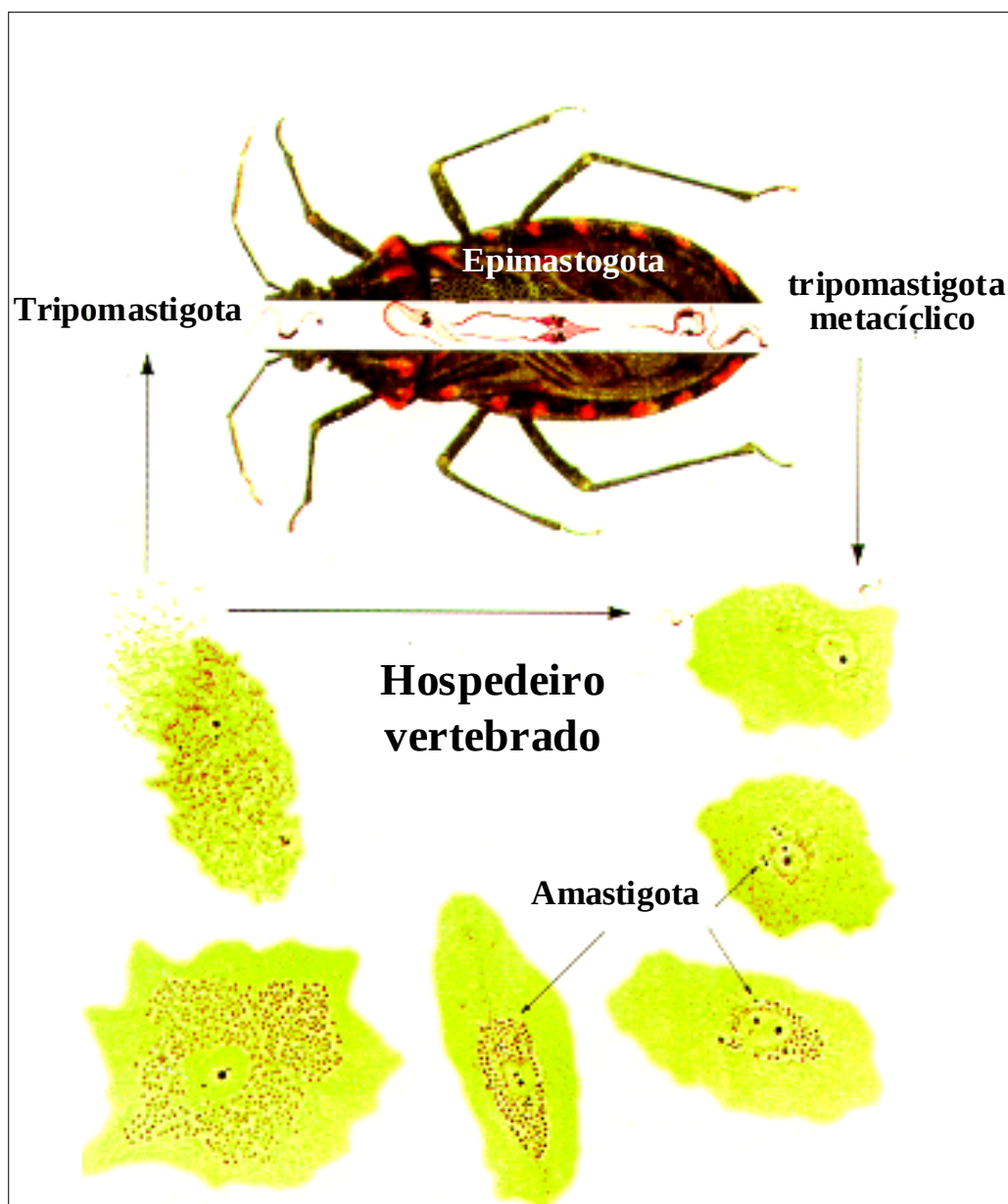


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi* (Colli, 1993).

1.2. Glicobiologia da superfície do *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas do *T. cruzi* podem invadir uma grande variedade de células de mamíferos *in vivo* e *in vitro* incluindo fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e neurônios, mostrando preferência por células do sistema fagocítico mononuclear e células musculares (Brenner, 1992). Apesar dos mecanismos moleculares responsáveis pela invasão da célula do hospedeiro ainda não terem sido completamente elucidados, já se sabe, que moléculas de superfície do parasito funcionam como ligantes ou receptores, em diferentes etapas do processo de infecção (Burleigh & Andrews, 1995). Devido à grande importância médica e por ser um parasito com replicação intracelular obrigatória, vários grupos de pesquisa têm concentrado seus estudos na identificação e caracterização dessas moléculas com o objetivo de determinar os mecanismos moleculares que regulam a adesão e a penetração do parasito nas células hospedeiras, e suas possíveis atuações no escape do sistema imune do hospedeiro.

Estudos de caracterização molecular da superfície do parasito revelaram a presença de um glicocálice espesso contendo glicoproteínas e glicolipídeos, cujas estruturas predominantes são os glicoinositolfosfolipídeos, as sialoglicoproteínas e proteínas da superfamília da *trans*-sialidase (TS) (Fig. 2).

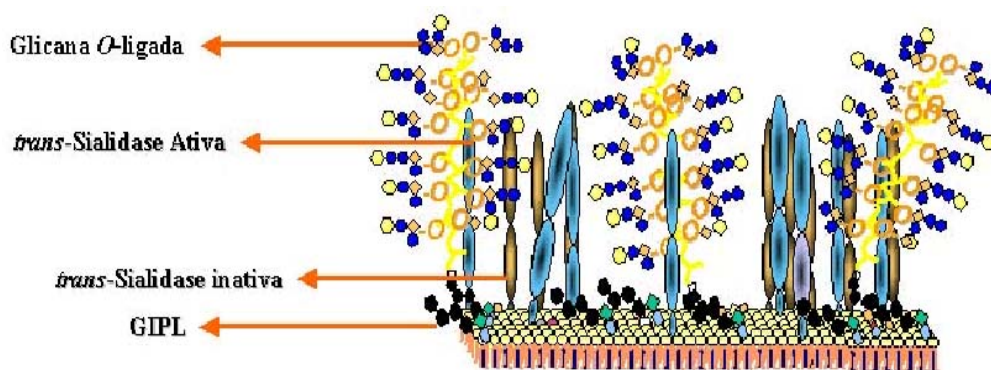


Figura 2: Representação esquemática da distribuição das principais moléculas de superfície do *T. cruzi*.

(i) Os glicoinositolfosfolípideos (GIPLs) (Previato *et al.*, 1990; Carreira *et al.*, 1996), primeiramente descritos como lipopeptideofosfoglicana (LPPG) (Lederkremer *et al.*, 1976), são glicolípídios expressos na superfície de vários protozoários parasitas de importância médica, como *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*. Os GIPLs são da família das moléculas GPI ancoradas apresentando a sub-estrutura (core) conservada $\rightarrow \text{Man}\alpha 1-4\text{GlcN}\alpha 1-6\text{-fosfatidilinositol}$ encontrada também em glicoproteínas sintetizadas por células de animais, protozoários e fungos (Ferguson, 1997). No *T. cruzi*, os GIPLs são encontrados em todos os estágios do parasito. No entanto, são menos abundantes nas formas tripomastigotas (10^6 moléculas de GIPL/célula) do que em epimastigotas (10^7 moléculas de GIPL/célula) (Golgher *et al.*, 1993).

(ii) As sialoglicoproteínas (Previato *et al.*, 1985; Schenkman *et al.*, 1993; Previato *et al.*, 1994, 1995; Todeschini *et al.*, 2001; Agrellos *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004; Buscaglia *et al.*, 2006), são denominadas moléculas semelhantes a mucinas devido à grande quantidade de oligossacarídeos *O*-ligados com unidades terminais de ácido siálico (AS), características estruturais encontradas em mucinas de mamíferos (Varki, 1992, 1997).

As O-glicanas representam mais de 60% da massa molecular das mucinas do parasita, conferindo um forte caráter hidrofílico a essas moléculas (Frasch, 2000; Acosta-Serrano *et al.*, 2001). O estudo dos genes que codificam a porção protéica das mucinas revelou uma família heterogênea de 500 a 850 membros com múltiplas cópias dispersas ao longo de todo genoma, que codifica uma família de proteínas chamada Tc-MUC (Di Noia *et al.*, 1996; Frash, 2000; Buscaglia *et al.*, 2006).

(iii) As proteínas da superfamília das *trans*-sialidases (TS), que são codificadas por aproximadamente 700 genes, representando 1-2 % do genoma do parasito (Kim *et al.*, 2005). Em tripomastigotas, as TS são divididas em dois grandes grupos: (a) Proteínas da família TS; (b) Proteínas do tipo TS. As proteínas pertencentes à família TS são codificadas por mais de 140 genes (Cremona *et al.*, 1999), responsáveis pela síntese de moléculas que variam de 60-200 kDa (Schenkman *et al.*, 1991). Os genes que codificam proteínas da família TS apresentam similaridades estruturais com o sítio ativo de sialidases virais e bacterianas e estão envolvidas na adesão e invasão de células do hospedeiro (revisto por Colli, 1993). Alguns membros desta família podem apresentar atividade enzimática (TSa) ou serem enzimaticamente inativos (TSi). Enquanto a TSa apresenta na posição 342 uma tirosina (Tyr³⁴²), a TSi apresenta uma histidina na mesma posição (His³⁴²) (Cremona *et al.*, 1995). No entanto, foi demonstrado, que no genoma do *T. cruzi* há o mesmo número de cópias para a forma ativa e inativa da enzima (Cremona *et al.*, 1999).

As proteínas do tipo TS apresentam cerca de 30 % de similaridade com o sítio ativo presente nas proteínas pertencentes à família TS, abrangendo todas as glicoproteínas gp85 e ASP-1 (Giordano *et al.*, 1999). No entanto, os membros são enzimaticamente inativos e não há evidências se tais proteínas apresentam propriedades lectínicas.

A TSa pode apresentar atividade sialidásica ou *trans*-sialidásica (revisto por Colli, 1993). Esta dicotomia depende da presença de moléculasceptoras. Na presença de um aceptor contendo unidades terminais de galactopirranose β ligada (β Galp) a TSa preferencialmente catalisa a transferência do AS α 2-3-ligado presente em glicoproteínas do hospedeiro para moléculas do tipo mucina presentes na superfície do parasito, sintetizando exclusivamente ligações AS α 2-3Gal β -x (revisto por Colli 1993). Na ausência do aceptor, há uma reação de hidrólise, onde o AS é então transferido para moléculas de água (Fig.3).

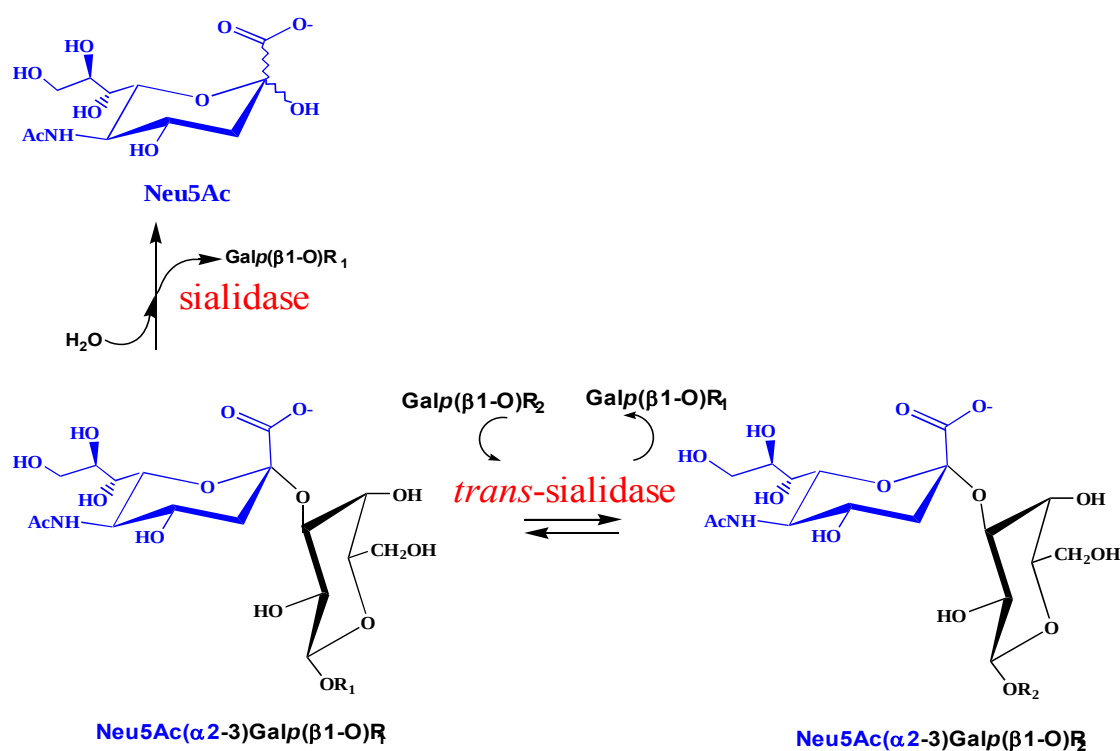


Figura 3. Esquema representativo das reações catalisadas pela TSa do *Trypanosoma cruzi*.

Em tripomastigotas, a TS é formada por dois domínios distintos (Cazzulo & Frasch, 1992; Campetella *et al.*, 1994; Schenkman *et al.*, 1994) (Fig. 4):

i) O domínio N-terminal que contém o sítio catalítico da TS, apresenta aproximadamente 680 amino ácidos resultando numa massa molecular aproximada de 60 kDa (Schenkman *et al.*, 1992; Campetella *et al.*, 1994);

ii) O domínio contendo a porção C-terminal é formado pela repetição de 12 amino ácidos D-S-S-A-H-(S/G)-T-P-S-T-P-(A/V) denominado SAPA e não é necessário para a atividade enzimática (Pollevick *et al.*, 1991; Cazzulo & Frasch, 1992). A porção C-terminal da TS permite a oligomerização e a ligação da enzima à superfície do parasita (âncora GPI) (Schenkman *et al.*, 1994) e induz a produção de anticorpos na fase aguda da doença de Chagas (Cazzulo & Frasch, 1992).

A enzima encontrada em epimastigotas apresenta as mesmas especificidades e propriedades cinéticas que a enzima expressa em tripomastigotas (Chaves *et al.*, 1993), porém, apresenta diferenças estruturais significantes. A enzima é monomérica, não apresenta a porção C-terminal e é transmembrânica (Chaves *et al.*, 1993).

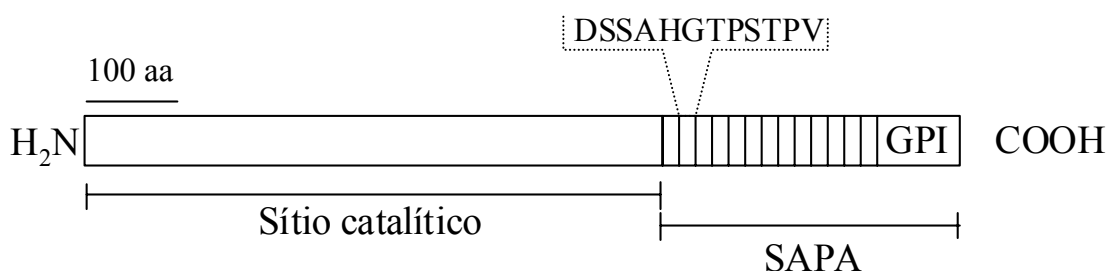


Figura 4. Representação esquemática da estrutura proteica da *trans*-sialidase.

Apesar da His³⁴² comprometer a atividade enzimática da TS, Todeschini e colaboradores (2002), demonstraram que a TSi liga-se a unidades de AS α 2-3-ligados a unidades de β Galp, atuando como uma adesina. A interação com estes açúcares ocorre de maneira orquestrada, a partir da exata ligação do sialosídeo (AS α 2-3 β Galp1-x) à proteína (TSi). Os autores sugeriram que tal ligação poderia desencadear uma mudança conformacional na enzima, criando um segundo sítio de ligação para o β -galactosídeo (Todeschini *et al.*, 2004). A existência de dois sítios de ligação na TSi sugere que a enzima seja capaz de ligar-se a duas moléculas na superfície da célula hospedeira (sialosídeo e β -galactosídeo) propiciando condições para sinalizações celulares. Estudos anteriores desenvolvidos pelo mesmo grupo (Todeschini *et al.*, 2002) demonstraram que a TSa e TSi são capazes de se ligar à sialomucina CD43 em linfócitos T, via o epítipo contendo o AS α 2-3-ligado a unidades terminais de β Galp.

Os resultados obtidos por diferentes grupos (Scudder *et al* 1993; Ribeirão *et al.*, 1997; Cremona *et al.*,1999; Todeschini *et al.*, 2004) demonstram que a TSa e a TSi são moléculas aptas a reconhecer resíduos de AS α 2-3 e β galactosídeos, encontrados comumente em glicanas O-ligadas e N-ligadas, podendo desempenhar funções imunomodulatórias durante a infecção pelo *T. cruzi*.

1.3. A *trans*-sialidase e o ciclo de vida do *T. cruzi*

No *T. cruzi* o AS foi primeiramente descrito na superfície de formas epimastigotas através do uso de lectinas e métodos colorimétricos (Pereira *et al.*, 1980), sendo mais tarde comprovado por cromatografia em camada delgada e cromatografia gás-líquida acoplada à espectrometria de massa (GC/MS) (Schauer *et al.*, 1983). Em 1985, Previato e colaboradores descreveram a capacidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* incorporarem

em sua superfície o AS de sialoglicoconjugados exógenos, sugerindo que a aquisição do AS em sialoglicoproteínas da superfície do *T. cruzi* não se dava pela rota convencional em que o CMP-Neu5Ac é doador desse açúcar, mas através de uma nova rota metabólica, envolvendo uma reação de *trans*-glicosilação para AS. Posteriormente, foi observada *in vivo* a incorporação do ácido N-glicolilneuramínico na superfície de tripomastigotas em camundongos infectados (Previato *et al.*, 1990). Em 1991, a atividade enzimática de glicosilase para AS apresentada pelo *T. cruzi* foi denominada *trans*-sialidase (Schenkman *et al.*, 1991), responsável pela transferência do AS de substratos exógenos para glicoproteínas presentes na superfície do *T. cruzi* formando o epitopo Ssp-3 específico de formas tripomastigotas (Andrews *et al.*, 1987). Essa atividade mostrou-se específica para moléculas de AS ligadas na configuração $\alpha 2-3$ para unidades terminais de βGalp , formando a subestrutura $\text{AS}\alpha 2-3\beta\text{Galp}1-x$ (Scudder *et al.*, 1993). A atividade *trans*-sialidásica foi detectada principalmente em formas tripomastigotas sanguíneas, quando comparada à atividade da enzima presente em epimastigotas de cultura. Na forma amastigota, a atividade TS nunca foi detectada (Harth *et al.*, 1987; Pereira *et al.*, 1983).

1.4. Imuno-regulação por moléculas do *T. cruzi* durante a infecção chagásica

O *T. cruzi* ao infectar o mamífero, habitualmente só causa doença em uma parcela dos indivíduos infectados, sugerindo que o sistema imune não permite, na maioria das vezes, a proliferação em grande escala dos protozoários. Alguns trabalhos sugerem que a permanência do *T. cruzi* no hospedeiro se dá em virtude do parasito possuir mecanismos que lhe permite escapar das agressões mediadas pelo sistema imune (Minoprio, 2001).

Muitos trabalhos têm demonstrado que molécula(s) de superfície e/ou secretadas pelo parasito são capazes de regular a resposta imune do hospedeiro. Camargo e colaboradores (1997) observaram que as mucinas da superfície do *T. cruzi* são capazes de induzir a secreção da citocina IL-12 por macrófagos via receptor Toll-2, e propuseram que o domínio contendo a âncora GPI das mucinas, seria o responsável por esta ativação. As mucinas do *T. cruzi* poderiam, assim, contribuir, indiretamente, para a ativação linfocitária e para a resposta inflamatória. No entanto, esses resultados não foram confirmados por de Diego e colaboradores (1997) que observaram que a molécula tipo mucina, Ag C10, de epimastigota de *T. cruzi*, induziu a síntese de IL-1 β , mas não de outras citocinas pró-inflamatórias como IL-12 ou TNF- α , sugerindo que a inibição da síntese dessas citocinas, pelo antígeno parasitário, poderia ser um dos mecanismos responsáveis pela evasão do parasito à resposta imunológica do hospedeiro.

Outra molécula do *T. cruzi* que vem sendo estudada, mas cuja função na infecção ainda não é totalmente elucidada é o GIPL. Gomes e colaboradores (1996) demonstram que a porção lipídica do GIPL, purificado de *T. cruzi*, foi capaz de inibir o efeito proliferativo de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, a secreção de IL-2 e bloqueou a expressão do receptor IL-2R quando co-injetado com o anticorpo ativador anti-CD3. Por outro lado, em linfócitos B, a porção oligossacarídica do GIPL foi capaz de induzir a ativação e secreção de imunoglobulinas, *in vitro* (Bento *et al.*, 1996) e *in vivo* (Bilate *et al.*, 2000), enquanto a porção ceramida, constituinte do domínio lipídico do GIPL induziu uma intensa morte de macrófagos por apoptose (Freire-de-Lima *et al.*, 1998). Brodskyn e colaboradores (2002) demonstraram ainda, que células dendríticas e macrófagos ativados com LPS, e tratados com GIPL de *T.*

cruzi apresentaram redução tanto na secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-8 e IL-12) quanto na expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86, CD40 e CD57).

Alguns autores têm apontado o GIPL como uma molécula fundamental durante os estágios iniciais da infecção, por induzir intenso recrutamento de neutrófilos para o peritônio, sendo esse fenômeno dependente de Toll-4, visto que camundongos Toll-4^{-/-} não apresentaram resposta inflamatória local (Oliveira *et al.*, 2004).

Uma proteína considerada como um fator de virulência do *T. cruzi* na doença de Chagas é a TS, seja por sua capacidade de proteger o parasito, impedindo sua destruição por proteínas séricas (complemento) direcionadas contra epitopos parasitários (Revisto por Colli, 1993); ou pelo estabelecimento do quadro infeccioso (Frasch, 1994, Chuenkova & Pereira, 1995). Durante a fase aguda da infecção chagásica é possível detectar no soro de pacientes infectados uma elevada quantidade de TS circulante (Cazzulo & Frash, 1992). A liberação da TS no soro pode ser considerada um mecanismo utilizado pelo parasito para evadir a resposta imunológica do hospedeiro, uma vez que os anticorpos direcionados contra a TS são produzidos, primeiramente, contra a região C-terminal (SAPA). O C-terminal da TS é mais imunogênico do que a porção N-terminal, que por sua vez contém a sequência de aminoácidos responsável pela atividade catalítica da enzima. Essa estratégia evitaria a produção de anticorpos produzidos precocemente contra a região N-terminal, não havendo a inibição da atividade enzimática nos estágios iniciais da infecção (Buscaglia *et al.*, 1998, 1999). A presença de seqüências repetitivas de aminoácidos no C-terminal da TS é responsável por sua elevada imunogenicidade desencadeando uma forte resposta imunológica na fase aguda da infecção (Cazzulo & Frash, 1992).

Chuenkova e Pereira (1995) demonstraram que a TS é um potente fator de virulência durante a fase aguda da doença de Chagas. Os autores evidenciaram que o tratamento de camundongos com a TSa promoveu o aumento da parasitemia e tornou os animais mais suscetíveis, levando à morte precoce, em relação ao grupo de animais controle. Além disso, os animais depletados de células T e B (SCID) mostraram-se resistentes ao tratamento com a TSa, sugerindo que os linfócitos poderiam estar envolvidos nesse processo.

A ativação policlonal de linfócitos T e B é uma característica de doenças causadas por bactéria, vírus e protozoários (Reina-San-Martin *et al.*, 2000). Esse tipo de resposta contribui para a evasão do agente infeccioso porque mascara/desvia a resposta imune específica contra o patógeno e dificulta o desenvolvimento de vacinas eficazes (Reina-San-Martin *et al.*, 2000). Resultados obtidos por Gao e colaboradores (2002) demonstraram que a porção C-terminal de proteínas da família TS foi capaz de ativar células B, induzindo a produção de anticorpos não específicos contra a enzima. No mesmo ano, resultados obtidos em nosso laboratório (Todeschini *et al.*, 2002) evidenciaram que a TSa e TSi coestimulam linfócitos TCD4⁺ *in vitro* e *in vivo* através do engajamento a unidades de AS α 2-3 na molécula CD43, levando à produção das citocinas IL-2 e TNF- α . A interação da TS com o CD43 foi, ainda, capaz de proteger contra a apoptose células TCD4⁺ isoladas de camundongos infectados. Por outro lado, Mucci e colaboradores (2002) demonstraram que a administração da TSa em camundongos não infectados foi capaz de induzir a apoptose de timócitos e células T maduras, um evento característico da fase aguda da infecção chagásica (Lopes *et al.*, 1995). Em 2005, foi demonstrado que a molécula CD43 não é necessária durante tal processo (Mucci *et al.*, 2005) e que os efeitos pró-

apoptóticos restritos à forma ativa da TS estão associados à re-sialilação de glicomoléculas presentes em timócitos duplo negativos no córtex tímico e células T maduras (Mucci *et al.*, 2006). Os resultados obtidos sobre os efeitos biológicos mediados por proteínas da família TS têm utilizado moléculas enzimaticamente ativas. No entanto, recentemente foi observada a capacidade da TSi de se ligar a unidades de AS presentes em células endoteliais, induzindo a ativação de NF- κ B e o aumento da expressão de moléculas de adesão, favorecendo a entrada do *T. cruzi* (Dias *et al.*, 2008).

Os exemplos aqui descritos sugerem fortemente que o *T. cruzi* explora a glicosilação de moléculas expressas pelo hospedeiro para a evasão da resposta imune, perpetuando a infecção.

1.5. Biossíntese de cadeias N-ligadas em mamíferos

A TSa pode atuar sobre glicoproteínas expressas na superfície celular. Em mamíferos, as glicoproteínas que carregam unidades de AS podem ser O ou N glicosiladas (Fuster & Esko, 2005; Berninsone, 2006; Varki, 2007).

A biossíntese de glicoproteínas N-ligadas em mamíferos (Fig. 5), ocorre no retículo endoplasmático (RE), após a montagem da cadeia oligossacarídica que é iniciada pela incorporação de unidades monossacarídicas ao dolicol-fostafo (DP), situado na membrana do RE (Jones *et al.* 2005). Duas unidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e cinco unidades de manose (Man) são sequencialmente transferidas para o DP na face citoplasmática do retículo, formando Man₅GlcNAc₂-DP (Fig. 5A i). Posteriormente, a sub-estrutura é transferida para o lúmen do RE (Fig. 5A ii), e mais quatro unidades de Man e três de glucose (Glc) são adicionadas formando a sub-estrutura Glc₃Man₉GlcNAc₂-

DP (Fig. 5A **iii**). A porção oligossacarídica é então transferida em bloco para o peptídeo nascente por intermédio de uma oligossacaridiltransferase (OST) onde o carbono 1 do açúcar redutor (GlcNAc) será ligado, por uma ligação amida, ao nitrogênio da asparagina (Glc₃Man₉GlcNAc₂-Asn) (Fig. 5A **iv**). O processamento da cadeia oligossacarídica inicia-se no RE, com a remoção de três unidades de Glc e uma unidade de Man, originando a sub-estrutura Man₈GlcNAc₂-Asn, sofrendo modificações posteriores no Golgi (Fig. 5A). A sub-estrutura Man₈GlcNAc₂-Asn pode ou não ser modificada pela ação de manosidases no Golgi, gerando o substrato (Man₅GlcNAc₂-Asn) (Fig. 5B) para a diversificação das glicoproteínas *N*-ligadas, que podem ser classificadas como high-manose, híbrida ou complexa (Fig. 5B). O tipo híbrida no Golgi atua como substrato para manosidases, *N*-acetilglucosaminil transferases e galactosil transferases, proporcionando a formação de cadeias lineares de polilactosamina, que são comumente encontradas nas formas híbridas e complexas das glicanas *N*-ligadas (Renkonen, 2000; Kotani *et al.*, 2004).

As galactoses presentes na estrutura de cadeias *N*-ligadas podem ser modificadas pela ação de α 2-3- (Fig. 1B **ii**) ou α 2-6- (Fig. 1B **i**) sialiltransferase (ST), gerando sítios de ligação para diferentes lectinas. Exemplos: a lectina *Sambucus nigra agglutinin* (SNA) (Fig. 5B **i**) específica para o dissacarídeo AS α 2-6Gal, a *Maackia amurensis* II (MAA II) (Fig. 5B **ii**) que apresenta especificidade para o trissacarídeo AS α 2-3Gal β 1-4GlcNAc. As figuras 5B **iii** e 5B **iv** representam cadeias *N*-ligadas do tipo complexa presentes na superfície de células T ativadas. A ativação de células T induz a diminuição das atividades α 2-3- e α 2-6-ST (Comelli *et al.*, 2006; Amado *et al.*, 2004). Esse mecanismo gera sítios de ligação para a lectina Ricina I (RCA I), que apresenta afinidade para unidades terminais de Galp (Quian *et al.*, 2007) (Fig. 5B **iii**) e para moléculas pertencentes à família das

galectinas, em especial galectina-1 (Fig. 5B **iv**) que apresenta especificidade para cadeias lineares de polilactosamina (Gal β 1,4GlcNAcGal β 1,4GlcNAc) (Zhou & Cummings, 1993) encontradas em glicoproteínas, como, CD43, CD45 e CD7 (Brewer *et al.*, 2002).

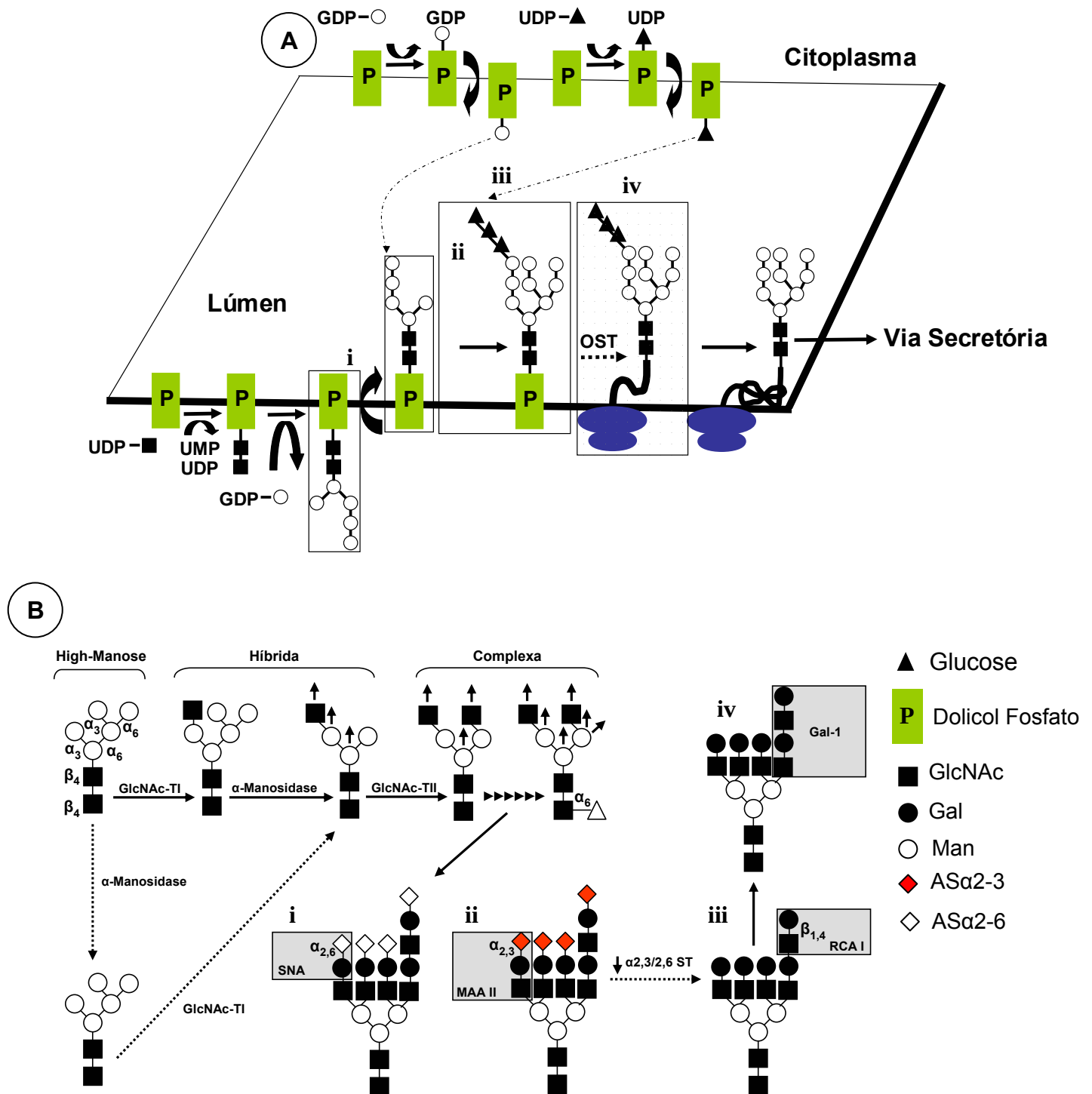


Figura 5. Esquema representativo da biossíntese de cadeias *N*-ligadas em mamíferos (Jones *et al.*, 2005). As setas (↑), representam que as cadeias oligossacarídicas podem futuramente ser alongadas pela ação de outras glicosiltransferases.

1.6. Biossíntese de cadeias O-ligadas em mamíferos

Inicialmente, a O-glicosilação de glicoproteínas (Fig. 6) ocorre no RE, onde unidades de N-acetilgalactosamina (GalNAc) são adicionadas a resíduos de serina ou treonina (Hattrup & Gendler, 2008). A sub-estrutura GalNAc-Thr/Ser atua como substrato para diversas glicosiltransferases no Golgi que competem entre si, podendo formar diversos cores oligossacarídicos (Fig. 6A) (Osinaga *et al.*, 2002). Vários trabalhos que abordam a imunoglicobiologia dos linfócitos T têm dado atenção aos efeitos mediados pelos cores de mucinas I e II, que são formados a partir da competição entre a α 2-3 ST-e a β 1-6-N-acetilglucosaminiltransferase (2 GnT) pelo substrato Gal β 1-3GalNAc α Thr/Ser (Fig. 6A, 6B). Esse dissacarídeo é gerado pela ação da β 1-3 galactosiltransferase sobre o complexo GalNAc-Thr/Ser. Se o dissacarídeo Gal β 1-3GalNAc α Thr/Ser for sialilado pela ação da α 2-3-ST, o core 1 é formado (Fig. 6B i). Contudo, se o dissacarídeo Gal β 1-3GalNAc α Thr/Ser sofrer a ação da 2 GnT, unidades repetitivas de Gal e GlcNAc são adicionadas, dando origem a cadeias lineares de polilactosamina (core 2) (Fig. 6B ii). Posteriormente, a galactose terminal ligada na configuração β 1-4 à unidade de GlcNAc, assim como à galactose ligada na configuração β 1-3 ao açúcar redutor GalNAc, podem sofrer a ação da α 2-3-ST, comprometendo o sítio de ligação das lectinas RCA I (Gal β 1-4GlcNAc) (Fig. 6B iv) e *peanut agglutinin* (PNA) (Gal β 1-3GalNAc) (Fig. 6B iii), assim como o sítio de ligação da galectina-1 (Gal β 1,4GlcNAc) (Fig. 6B v).

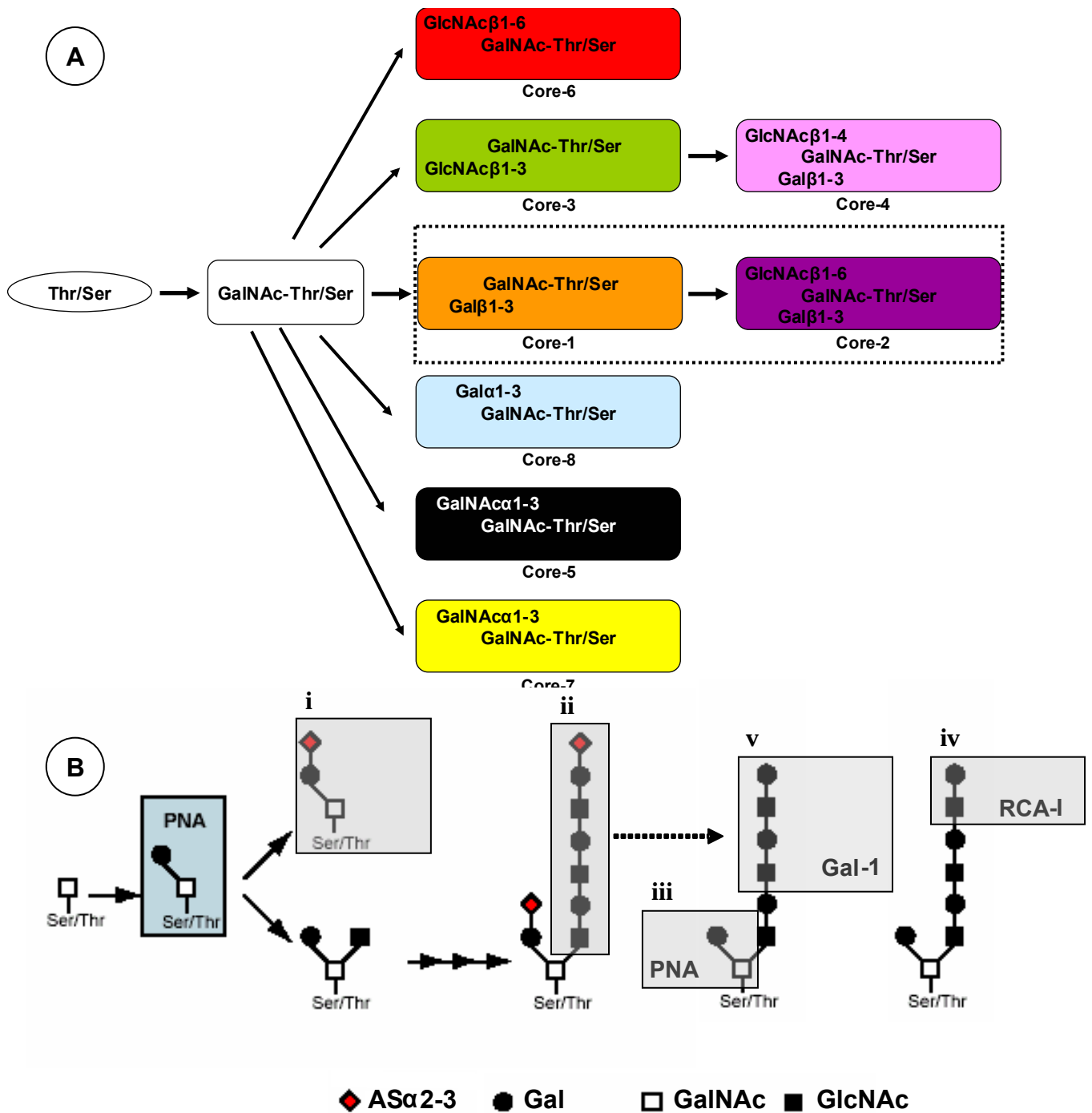


Figura 6. Esquema representativo da biossíntese de cadeias *O*-ligadas em mamíferos (Osinaga *et al.*, 2002).

1.7. Sialiltransferases e linfócitos T

Os eventos de diferenciação e ativação de células T são acompanhados por uma remodelagem programada de estruturas glicanas de superfície celular (Rudd *et al.*, 2001). No final da década de 70, as lectinas que apresentam domínios reconhecedores de carboidratos (CRD) foram usadas para separar sub-populações de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de células tronco de acordo com o glicofenótipo das glicoproteínas de superfície (Reisner *et al.*, 1978). Desde então, lectinas com diferentes especificidades vêm sendo usadas, na tentativa de evidenciar a importância de epítomos sacarídicos envolvidos nas etapas do desenvolvimento celular.

As células eucarióticas são recobertas por glicoproteínas, que são sintetizadas por um conjunto de glicosiltransferases e glicosidases, que de maneira harmônica remodelam a superfície celular, e determinam funções específicas (Hart, 1992).

Dentre as glicosiltransferases, as ST, que são enzimas associadas à membrana do Golgi, são responsáveis por sialilar unidades não redutoras de β Galp nas cadeias O- e N-ligadas. As ST apresentam ampla distribuição, sendo encontradas em diferentes órgãos e tecidos, e utilizam como substrato, diferentes epítomos sacarídeos (Harduin-Lepers *et al.*, 1995, 2001). Até o momento foram descritos mais de 15 tipos de ST capazes de sialilar glicoproteínas e glicolipídeos (Harduin-Lepers *et al.*, 2001). Em mamíferos, o AS encontra-se formando ligações do tipo α 2-3- ou α 2-6- com uma β Galp. Mais raramente, pode ser encontrado ligado na configuração α 2-6- a uma GalNAc. Homopolímeros de AS com ligações do tipo α 2-8- ou α 2-9- ligados também são descritos (Virm *et al.*, 2004; Harduin-Lepers *et al.*, 1995).

No desenvolvimento de linfócitos T, vários trabalhos demonstram a importância de ST em diferentes etapas do desenvolvimento celular. Notavelmente, a conversão fenotípica de PNA^{high}, característica de timócitos

duplo positivos (DP) ($CD4^+CD8^+$) para PNA^{low} , fenótipo típico de timócitos simples positivos (SP) ($CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$) é resultado do aumento da atividade $\alpha 2-3$ -ST durante o processo de seleção positiva no córtex tímico (Priatel *et al.*, 2000; Gillespie *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1997). Nessa etapa, a galactose terminal do dissacarídeo $Gal\beta 1-3GalNAc\alpha Thr/Ser$ está substituída por AS na configuração $\alpha 2-3$ ($AS\alpha 2-3Gal\beta 1-3GalNAc\alpha Thr/Ser$), comprometendo o sítio de ligação da lectina PNA, que como mencionado acima, apresenta especificidade para o core-1 da glicoproteína tipo mucina ($Gal\beta 1-3GalNAc\alpha Thr/Ser$).

A atividade $\alpha 2-3$ -ST mostrou-se importante durante o desenvolvimento de células T $CD8^+$ (Moody *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a cadeia β do co-receptor CD8 precisa ser sialilada para adquirir a conformação adequada, permitindo, a interação do CD8, presente na superfície do timócito, com a molécula de MHC I expressa pelas células epiteliais do córtex tímico. Durante a seleção tímica, os timócitos que expressam um TCR não reativo ou com grande afinidade pelo complexo MHC-peptídeo próprio são eliminados por apoptose. Por outro lado, os timócitos que expressam um TCR com baixa afinidade a esse complexo, diferenciam-se em células T maduras, que são liberadas no sangue periférico (Starr *et al.*, 2003). De maneira surpreendente, após a maturação, as células T perdem a sensibilidade para ligantes de baixa afinidade, tornando-se mais sensíveis à interação com peptídeos de alta afinidade (Lucas *et al.*, 1999; Davey *et al.*, 1998). Em 2001, Moody e colaboradores demonstraram pela primeira vez, que timócitos apresentavam mais avidez ao complexo MHC-peptídeo do que células T maduras. Nesse trabalho foi sugerido, que esse fenômeno estaria relacionado aos diferentes graus de sialilação observados entre os timócitos e células T maduras, uma vez que após o

tratamento das células T maduras com neuraminidase, liberando as unidades de AS, foi possível observar o aumento da avidéz destas células pelo complexo MHC-peptídeo. Em 2003 a teoria de Moody e colaboradores (2001) foi comprovada, sendo demonstrando que as diferenças observadas na formação de conjugados APC/célula T eram realmente devido ao aumento da atividade $\alpha 2-3$ ST em células T maduras (Starr *et al.*, 2003). Esses dados demonstraram que a atenuação do TCR por peptídeos de baixa afinidade em células T maduras estava relacionada aos diferentes níveis de sialilação que são coordenadamente regulados durante o desenvolvimento e dinamicamente mantidos por interações próprias contínuas na periferia.

Após a ativação de populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺, os linfócitos passam a apresentar um glicofenótipo PNA^{high}, devido a redução das atividades $\alpha 2-3$ e $\alpha 2-6$ ST (Comelli *et al.*, 2006; Amado *et al.*, 2004; Chervenak & Cohen, 1982). No entanto, a redução da atividade $\alpha 2-3$ ST, em células T CD4⁺, ocorreu somente em células T *helper* 1 (Th1), mas não em T *helper* 2 (Th2) (Grabie *et al.*, 2002), uma vez que apenas as células Th1 apresentaram baixos níveis de expressão de mRNA para esta glicosiltransferase após sua ativação. Grabie e colaboradores (2002) demonstraram ainda, que as células Th1, ao contrário das células Th2 apresentavam altos níveis de expressão da glicoforma de alta massa molecular da sialomucina CD43 (130 kDa), devido ao aumento da atividade 2 GnT. A atividade desta glicosiltransferase é essencial para a formação do core-2 das mucinas (Sperandio *et al.*, 2001). O core-2 atua como substrato para fucosiltransferases (FT) e ST no Golgi, contribuindo para a biossíntese de epítomos sacarídicos presentes em glicoproteínas leucocitárias, tal como o epítomo Sialil Lewis X (SLe^X), que são necessários para a interação dos linfócitos com selectinas presentes na célula endotelial ativada durante as respostas inflamatórias (Lasky, 1994). Em estudos mais recentes (Toscano *et al.*, 2007), foi demonstrado que após a

polarização de células Th1, Th2 e T *helper* 17 (Th17) *in vitro* e *in vivo*, apenas as células Th1 e Th17 apresentaram características glicofenotípicas semelhantes e foram sensíveis à morte celular induzida pelo tratamento com galectina-1. Foi ainda evidenciado, que esta susceptibilidade à galectina-1 foi ocasionada pela redução da atividade $\alpha 2,3$, mas não $\alpha 2-6$ ST.

Apesar de vários trabalhos descreverem que os linfócitos T após a sua ativação apresentam um fenótipo PNA^{high}, Hernandez e colaboradores (2007) demonstraram, que em células T CD4⁺ ativadas foi possível detectar o aumento da atividade $\alpha 2-3$ ST, que se mostrou capaz de sialilar o dissacarídeo Gal β 1-3GalNAc α Thr/Ser presente na isoforma CD45RB da glicoproteína CD45. Apesar da importância biológica deste epítipo sacarídico ainda ser desconhecida em células TCD4⁺ ativadas, esses resultados mostraram pela primeira vez, que a remodelagem de glicoproteínas de superfície celular em células T não são eventos celulares gerais, sendo consideradas microheterogeneidades estruturais presentes em glicoproteínas específicas.

Em células TCD8⁺, a redução da sialilação favoreceu as interações intermoleculares mediadas entre o complexo MHC-peptídeo e o TCR, modulando positivamente a cinética de ativação (Pappu & Shrikant, 2004) e a resposta citotóxica de células TCD8⁺ antígeno específicas (Akha *et al.*, 2006). Esses eventos podem ser explicados pelo aumento das interações homo e heterotípicas ocasionadas pela ausência do AS, que por apresentar uma carga negativa muito elevada, atuaria como uma barreira física no contato célula-célula.

Resultados recentes relacionaram, de maneira interessante o perfil de glicosilação de células dendríticas imaturas e maduras (Bax *et al.*, 2007). Nesse trabalho foi demonstrado que a maturação de células dendríticas *in vitro* foi acompanhada pelo aumento da atividade de sialiltransferases. Os autores concluíram que os diversos perfis

de glicosilação observados em estruturas glicanas de diferentes tipos celulares podem facilitar interações intermoleculares, que são requeridas na indução das respostas imunológicas.

1.8. Resposta mediada por células T CD8⁺

Os mais importantes mediadores da resposta imune contra infecções causadas por patógenos, tais como vírus, bactérias e parasitas são os linfócitos T CD8⁺ (Dzierszinski & Hunter, 2008; Zhou, 2007; Behar *et al.*, 2007; Tarleton, 2007). Para que tal resposta seja iniciada é necessária a participação de células apresentadoras de antígeno (APC) no processamento do antígeno derivado do patógeno e sua apresentação pelo MHC I. Durante a infecção, a resposta mediada por células T CD8⁺ pode ser dividida em três fases: (i) fase de expansão (diferenciação/proliferação), (ii) fase de contração e (iii) geração de memória.

A ativação de células T é desencadeada por uma série de eventos moleculares e bioquímicos (Minoprio *et al.*, 1986). A principal proteína envolvida na ativação do linfócito T, por lhe conferir especificidade ao antígeno ligado ao MHC, é o receptor de antígeno denominado TCR. Moléculas acessórias e interações cognatas também participam do processo de ativação, seja na adesão dos linfócitos T aos APCs ou na ativação de outras vias de sinalização. Os co-receptores CD4 e CD8 dos linfócitos ligam-se respectivamente, ao MHC II ou MHC I, presentes nas células alvo transmitindo sinais através da porção intracitoplasmática de uma proteína tirosina quinase (PTK) pertencente à família src (p56lck). Ainda, CD2, LFA-1 e outras integrinas linfocitárias interagem com seus ligantes LFA-3, ICAM-1 e ICAM-2, exercendo funções de adesão e co-estimulação (Clark & Ledbetter, 1994).

A produção de componentes necessários à proliferação de células T exige dois sinais distintos. Um é desencadeado pelo engajamento do linfócito T ao seu ligante natural, um antígeno, ou pelos anticorpos anti-TCR ou anti-CD3. Este processo leva à sinalização que envolve o complexo CD3, levando à ativação de tirosinas quinases, elevação dos níveis de cálcio e a ativação da proteína quinase C (PKC). O segundo sinal, que não é específico ao antígeno foi denominado sinal co-estimulatório, pois embora essencial, não é capaz por si só de induzir resposta em células T (Alegre *et al.*, 2001). CD80/B7.1 e CD86/B7.2 são os ligantes de CD28 na superfície de células T. Tais ligantes são expressos em níveis baixos em APCs em repouso (Alegre *et al.*, 2001) e em altos níveis após a ativação de células T em um período que varia de 24 a 96 horas. Após este período os níveis declinam rapidamente (Hathcock *et al.*, 1994; Lenschow *et al.*, 1994).

A cinética de expansão de células T CD8⁺ está diretamente relacionada com o tipo de microrganismo envolvido. Em infecções causadas por vírus, bactérias ou protozoários, a expansão pode ocorrer entre os dias 4 e 8 pós-infecção. (Stambas *et al.*, 2007; Tzelepis *et al.*, 2006; Pope *et al.*, 2001; Sano *et al.*, 2001).

Após a eliminação do patógeno, as células T CD8⁺ antígenos específicas passam por um processo conhecido como fase de contração, onde cerca de 85-95 % das células são eliminadas por apoptose. As células T CD8⁺ que sobrevivem à fase de contração, constituem uma população de “memória imunológica” capaz de ser mantida na ausência do antígeno (Masopust & Ahmed, 2004). Esta “memória imunológica” permite que o sistema imune responda mais rápido aos patógenos que já foram encontrados previamente, e reflete a preexistência de uma população expandida de clones de linfócitos antígeno-específicos (Harty & Badovinac, 2008). Ainda não se sabe como esta “memória imunológica” é mantida, mas dois mecanismos são sugeridos: (i) A “memória” é mantida por linfócitos de vida longa (até 15-20 anos), induzidos pela

exposição original e que persistem num estado de repouso até um segundo encontro com o antígeno; (ii) A “memória” é mantida pela persistência do antígeno em pequenas quantidades que são suficientes para re-estimular as células ativadas, mas não para disseminar a infecção para outras (Stemberger *et al.*, 2007). Estas células de memória são divididas em 2 populações, que apresentam localizações anatômicas e marcadores de superfície celular diferenciados. As células de memória central (T_{CM}) são caracterizadas por serem encontradas nos linfonodos e expressam CD62L e CCR7 e as células de memória efetora (T_{EM}), que não expressam selectinas e receptores de quimiocinas, sendo encontradas comumente nos tecidos periféricos (Stemberger *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos vêm tentando explicar a relação entre estas duas populações de células de memória durante o desencadeamento da resposta imune protetora. Dentre os modelos propostos, pode-se destacar o “modelo de diferenciação progressiva” e o “modelo de diferenciação linear” (Lanzavecchia & Sallusto, 2000; Wherry *et al.*, 2003). No “modelo de diferenciação progressiva” é sugerido que enquanto algumas células T *naïve* tornam-se células T efetoras completamente diferenciadas durante a infecção, outras param num estado intermediário de diferenciação. No fim da resposta primária, as células do estado intermediário de diferenciação darão origem às células T_{CM} , as quais sofrerão a diferenciação terminal após o re-estímulo com o antígeno. Já as células T efetoras completamente diferenciadas permanecem vivas dando origem às células T_{EM} , as quais serão capazes de providenciar proteção imediata em um próximo contato com o antígeno (Lanzavecchia & Sallusto, 2000). O “modelo de diferenciação linear” sugere que após o encontro com o antígeno, às células T *naïve* diferenciam-se em T_{EM} . Após a eliminação do patógeno, tais células diferenciam-se em T_{CM} . Contudo, numa

segunda re-exposição ao antígeno, as células T_{CM} convertem-se rapidamente em T_{EM} proporcionando uma efetiva resposta protetora (Wherry *et al.*, 2003).

Duas vias citototoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺, a mediada por Fas/FasL e a mediada por exocitose de grânulos (perforina/granzima). A estimulação do TCR pode induzir a expressão de Fas nas células T ativadas, que interage com o FasL presente em células alvo. Esta interação provoca a ativação de caspases em células alvo, resultando na clivagem de substratos apoptóticos adicionais que levam à fragmentação do DNA e à apoptose (revisto por Russel & Timothy, 2002).

A estimulação do TCR também pode levar à produção de grânulos citotóxicos (perforina/granzimas) pelas células T ativadas. Quando esta célula reconhece uma célula alvo e a ela se conjuga, a perforina (na presença de cálcio) polimeriza e forma uma estrutura do tipo anel que aparentemente contém um poro central. Supõe-se que este canal permite a passagem de granzimas, as quais ativarão as caspases e induzirão a apoptose como descrito acima (revisto por Russel & Timothy, 2002).

1.9. Papel das células TCD8⁺ na doença de Chagas

O sucesso da sobrevivência do *T. cruzi* no mamífero depende da sua capacidade de invadir as células do hospedeiro, e penetrar e multiplicar-se no interior das células do hospedeiro e evadir o sistema imunológico (Zambrano-Villa *et al.*, 2002). A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por uma ativação policlonal linfocitária (Minoprio *et al.*, 1986; DosReis *et al.*, 2005). A resposta é iniciada quando o antígeno alcança os tecidos linfóides, especialmente, a região periarteriolar do baço e o paracórtex do linfonodo. O reconhecimento de antígenos nestes sítios, compostos basicamente de linfócitos *naive*, desencadeia a ativação policlonal (Celli *et al.*, 2008).

O balanço existente entre as duas subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, certamente, exerce influência na evolução das lesões presentes na infecção chagásica. (Tarleton, 1995). A subpopulação TCD4⁺ Th1, mostra-se responsável pela secreção de citocinas de caráter pró-inflamatório, como IL-2, TNF- α , TNF- β e INF- γ , apresentando um efeito protetor; e TCD4⁺ Th2 que secreta as citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (DosReis, *et al.*, 2005), apresentando um efeito deletério durante a infecção chagásica murina. A subpopulação de células TCD4⁺ apresenta, sem dúvida, grande relevância na imunidade contra a infecção, seja pela produção de citocinas, que são requeridas para a ativação de fagócitos e também de linfócitos TCD8⁺, que reconhecem e destroem as células infectadas. A ausência de uma destas subpopulações de células T resulta em uma infecção não controlada e letal (Kumar & Tarleton, 1998; Tarleton *et al.*, 1995).

como mencionado anteriormente, o *t. cruzi* entra na célula hospedeira, escapa do interior de um vacúolo parasitóforo pela ação de uma proteína formadora de poros (tipo porina), e ocorre a liberação dos parasitos para o citoplasma (andrews, 1994). em células de mamíferos, todas as proteínas citoplasmáticas são sensíveis à degradação mediada por enzimas do proteossoma, sendo os peptídeos resultantes transportados para o re. no re, os peptídeos de seqüências e tamanhos apropriados se associam às moléculas de mhc i antes de serem expressas como complexos peptídeo-mhc na superfície celular. este fenômeno ocorre comumente em todas as células de mamíferos para gerar amostras do conteúdo citoplasmático para os linfócitos t cd8⁺. quando estes peptídeos são oriundos de proteínas codificadas por microrganismos invasores, como por exemplo, o *t. cruzi*, os linfócitos t cd8⁺ são capazes de reconhecê-los, e iniciam rapidamente uma resposta protetora eliminando as células infectadas na tentativa de neutralizar o crescimento exacerbado do parasito (tarleton, 2004).

as primeiras evidências sobre a importância dos linfócitos t cd8⁺ na infecção experimental pelo *T. cruzi* foi demonstrada através da infecção de camundongos nocautes (ko) (cd8ko, β -2 microglobulina ko) ou tratados com anticorpos anti-cd8, resultando em elevada parasitemia e susceptibilidade em relação aos animais controles (tarleton *et al.*, 1992; rottenberg *et al.*, 1993 e tarleton, 1990). foi demonstrado ainda que a importância de células t cd8⁺ não é restrita à fase aguda da infecção, uma vez que a depleção destas células em camundongos cronificados resultou no aumento da carga parasitária e resposta inflamatória exacerbada (tarleton *et al.*, 1994).

Embora exista pouca informação sobre a biologia celular de formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, bem como das moléculas que estas formas evolutivas produzem e secretam no citoplasma da célula hospedeira e no soro de indivíduos infectados, é plausível imaginar que durante os processos de diferenciação e replicação, proteínas parasitárias entrem na via de processamento de MHC I em células infectadas.

Como observado em outros tripanossomatídeos, no *T. cruzi*, grande parte das proteínas de superfície celular são ancoradas via GPI. Estas proteínas podem ser liberadas ou secretadas pelo parasita e entrarem na via de processamento de MHC I (Tarleton, 2004). Este fenômeno foi demonstrado pela primeira vez por Garg e colaboradores (1997), usando um peptídeo de ovabulmina (OVA) de galinha expresso no *T. cruzi* como uma proteína citoplasmática, secretada, ou ancorada por uma sequência transmembrana ou GPI ancorada. Neste estudo foi demonstrado que células infectadas com *T. cruzi*, onde a OVA foi expressa como uma proteína secretada ou GPI ancorada foi rapidamente reconhecida por células T CD8⁺ específicas para o peptídeo da OVA. No entanto, as células que foram infectadas com parasitas que expressavam a OVA como uma proteína citoplasmática ou transmembrana não foram reconhecidas.

Subseqüentemente, várias proteínas secretadas ou ancoradas a superfície de formas amastigotas e tripomastigotas têm sido identificadas como alvos potenciais de respostas mediadas por células T CD8⁺ (Rodrigues *et al.*, 1999; Wize *et al.*, 1997). Dentre tais moléculas, pode-se destacar proteínas pertencentes à superfamília das TS, uma vez que respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção pelo *T. cruzi* são, em grande parte, direcionadas contra epítomos presentes em proteínas pertencentes a esta superfamília (Martin *et al.*, 2006). Um dos primeiros peptídeos pertencentes a esta superfamília identificados como um alvo potencial de células T CD8⁺ durante a infecção pelo *T. cruzi* foi o antígeno-1 de superfície de tripomastigotas (TSA-1), que promoveu proteção em camundongos infectados com uma dose letal do parasito (Wize *et al.*, 1997). Estudos de imunização utilizando este (Wize *et al.*, 1998), e outros peptídeos pertencentes à superfamília da TS sob condições capazes de induzir resposta mediada por células T CD8⁺, também foram capazes de proteger camundongos contra uma infecção letal (Garg & Tarleton, 2002).

Trabalhos recentes têm descrito vários epítomos presentes em proteínas de superfície celular nas formas amastigotas e tripomastigotas reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção com parasitas de diferentes cepas e em camundongos de diferentes linhagens (Tzelepis *et al.*, 2008; 2007, 2006; Martin *et al.*, 2006). Estes trabalhos permitiram o estudo da cinética de aparecimento de linfócitos T CD8⁺ específicos contra tais peptídeos, sendo demonstrado que a expansão inicia-se no pico da parasitemia em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, e atinge o pico no 15º dia após a infecção (Tzelepis *et al.*, 2006). Durante a infecção com outras cepas menos virulentas foi observado que o pico da resposta de células T CD8⁺ específicas variou do 14º ao 24º dia após a infecção (Tzelepis *et al.*, 2006). Estes trabalhos reforçaram as evidências de que os linfócitos T CD8⁺ são importantes e requeridos para

a geração de resposta imune protetora durante a infecção pelo *T. cruzi*. Além disso, demonstram que peptídeos encontrados em proteínas GPI ancoradas ou secretados pelo parasito são alvos potenciais de tais respostas podendo ser usados como candidatos para o desenvolvimento de vacinas, bem como ferramentas de estudo para o melhor entendimento da funcionalidade destas células durante a infecção pelo *T. cruzi*.

2. Objetivos

2. Determinar os possíveis mecanismos moleculares que contribuem para que a TS atue como fator de virulência durante a infecção chagásica experimental.

2.1. Estudar os efeitos *in vivo* da TSa e TSi durante a infecção pelo *T. cruzi*, levando em consideração os seguintes parâmetros:

2.1.1. Parâmetros parasitológicos

- parasitemia,
- histopatologia,
- PCR em tempo real,
- sobrevivência.

2.1.2. Parâmetros celulares

- Imunohistoquímica,
- Citometria de fluxo.

2.2. Avaliar, especificamente, esses efeitos em linfócitos T:

2.2.1. Análises glicofenotípicas das células T.

2.2.2. Avaliação do efeito citotóxico de células T CD8⁺ antígeno específicas *in vitro* e *in vivo*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos selvagens machos da linhagem Balb/c e animais deficientes para o ligante de FAS (*gld*) (*FASL^{-/-}*) com 6-8 semanas. Os animais foram mantidos no Laboratório de Animais Transgênicos (LAT) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e manipulados de acordo com as novas regras do comitê de ética em experimentação animal.

3.2. Parasitas e Infecção

Os camundongos Balb/c foram infectados com a forma tripomastigota sanguínea da cepa Y, mantida por passagens sucessivas *in vivo*. O sangue contendo os tripomastigotas foi coletado através de punção cardíaca; e os parasitas isolados foram diluídos em tampão fosfato-salina (PBS) e contados em câmara de Neubauer para a padronização do número de parasitas para ser utilizado como inóculo intraperitônio nos camundongos Balb/c. Todos os experimentos foram realizados com inóculos de 10⁴ parasitas/animal e os camundongos foram sacrificados no 8º ou 15º dia pós-infecção (dpi).

3.3. obtenção da forma ativa (tsa) e inativa (tsi) da *trans*-sialidas

As *trans*-sialidases recombinantes ativa (TSa) e inativa (TSi) foram obtidas a partir de *E. coli* (MC 1061) eletrotransformada, contendo a construção do gene completo da TSa (TSREP.C no vetor TrcHisA) ou TSi (Tyr342-His no vetor TrcHisA). Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Dr. C. A Frash, do Instituto de Investigações Biotecnológicas, da Universidade Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina. Inicialmente as bactérias foram cultivadas em meio *Terrific*

Broth (TB, Difco) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina a 37 °C. Após 8 h, quando a cultura atingiu uma densidade óptica de 1.0 a 600 nm, a expressão da enzima foi induzida pela adição de 30 mg/L de Isopropil-β-D-thiogalactopiranosídeo (IPTG, Sigma), e as células foram incubadas *overnight* sob agitação (100 rpm) a 28 °C. No dia seguinte, as bactérias foram lisadas em solução contendo Tris-HCl 20 mM, lisozima, 2mg/mL; Triton X-100, 2 %; PMSF, 0,1 mM; leupeptina, 5 mg/mL; iodoacetamida, 0,1 mM; e inibidor de tripsina, 1 mg/L. Após a lise, a DNase-I (5 µg/ml) foi adicionada para a diminuição da viscosidade. A suspensão foi centrifugada a 15000 xg durante 10 minutos a 4 °C e o pellet descartado. Ambas enzimas foram purificadas por cromatografia de quelação com Ni²⁺ (Buschiazzo *et al.*, 1996) e eluídas separadamente em um gradiente de imidazol (0-1M). A fração obtida foi dializada em tampão Tris-HCl, 20 mM pH 7,8 e submetida a cromatografia de troca iônica em colunas Mono-Q e Mono-S, após eluição em um gradiente de NaCl (0-1M). A homogeneidade das preparações enzimáticas foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) na presença de SDS. Após a purificação, a TSa e a TSi foram aplicadas em uma coluna de polimixina-B imobilizada em agarose (Sigma), esterilizadas em filtros (0,22 µm) e estocadas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,8 a 4° C.

3.4.Tratamento de camundongos com TSa e TSi

Os camundongos Balb/c foram divididos em 8 grupos, contendo 7-10 animais/grupo. Grupo 1: camundongos normais (N); Grupo 2: camundongos normais tratados com TSi (NTSi); Grupo 3: camundongos normais tratados com TSa (NTSa); Grupo 4: camundongos infectados (INF); Grupo 5: camundongos infectados tratados com TSi (ITSi); Grupo 6: camundongos infectados tratados com TSa (ITSa), Grupo 7: camundongos infectados tratados com TSa e TSi (1:1). As enzimas foram administradas na concentração de 30 µg por via endovenosa 1 h antes da infecção, assim como no 1° e

2º dpi. Os grupos correspondentes aos controles (1 e 4) foram tratados com PBS, o veículo de administração das enzimas. Os camundongos foram sacrificados no 8º ou 15º dpi. A secreção espontânea de citocinas por células T esplênicas, bem como as características fenotípicas das células T presentes no tecido cardíaco e baço de cada grupo experimental, foram analisadas por ELISA, histopatologia, imunohistoquímica e citometria de fluxo como descrito nos itens posteriores.

3.5 Ensaio da atividade *trans*-sialidásica no plasma de camundongos Balb/c

A reação de *trans*-glicosilação para ácido siálico foi determinada pela formação de sialil-[¹⁴C-lactosamina] a partir da mistura reacional contendo 10 µl do plasma de camundongos N ou NTSa e INF ou ITSa em 1 mM de sialillactose e 0,4 nM [¹⁴C-lactosamina] em 10 µL de Tris/HCl 20 mM pH 7,2. Após incubação à temperatura ambiente, a reação foi finalizada pela adição de 1 mL de água destilada. O produto radioativo sialilado foi purificado por cromatografia em coluna de 1 mL de DOWEX 1X8, equilibrada com água destilada. ¹⁴C-lactosamina foi eluída com 20 mL de água e a sialil-[¹⁴C-lactosamina] ligada à coluna foi eluída com 3 mL de acetato de amônio 0,8 M e quantificada por cintilação líquida.

3.6. Coleta e marcação de linfócitos para citometria de fluxo

O coração coletado foi cortado com o auxílio de um bisturi, em fragmentos de 1-2 mm em solução salina a 4 °C. Os fragmentos foram submetidos a 4 ciclos de digestão com collagenase IV, 0,2 % por 15 min em banho maria a 37 °C. As células esplênicas foram obtidas após maceração do baço com o auxílio de um êmbolo de seringa estéril. As células isoladas foram centrifugadas a 300 xg durante 10 minutos, e transferidas para R10 (RPMI suplementado com 2 mM glutamina, 10

µg/ml gentamicina, 1 mM piruvato de sódio e 10 % de soro fetal bovino (SFB)). Após estas etapas, as células foram incubadas em RPMI, suplementado com 10 % de soro de camundongo e 3 % de SFB inativado, durante 15 min em banho de gelo para o bloqueio de receptores para a porção Fc de imunoglobulinas G (FcγR). Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,2, seguindo-se de anticorpos monoclonais fluorescentes. Para as análises fenotípicas, foram feitas marcações triplas nos esplenócitos totais, sendo os anticorpos direcionados contra ambos subsets (α -CD4⁺-PE e α -CD8⁺-APC) incubados em associação com o marcador de ativação α -CD44-FITC a 4° C durante 30 minutos. Para as análises glicofenotípicas, as células T foram marcadas com os anticorpos direcionados contra ambos co-receptores (α -CD4⁺-PE e α -CD8⁺-APC), em associação com as lectinas peanut agglutinin (PNA) ou *Maackia amurensis* I (MAA I), que reagem respectivamente, com os epítomos sacarídicos (Galβ1,3GalNAc-x) e (SAα2,3Galβ1,4GlcNAc). Para monitorar os eventos apoptóticos das células T, os esplenócitos de camundongos Balb/c selvagens (WT) ou *gld* (deficientes para o ligante de FAS) foram incubados com os mesmos anticorpos direcionados contra células T descritos acima (α -CD4⁺-PE e α -CD8⁺-APC) em associação com Anexina-V-FITC durante 20 min a 4° C em solução salina contendo 5 mM de CaCl₂. As células que foram marcadas com anticorpos (α CD4, α CD8, α CD44) e/ou com as lectinas (PNA, MAA I) fluorescentes foram lavadas 2 vezes em PBS e fixadas em paraformaldeído 1 %. Já as células que foram tratadas com Anexina V-FITC, foram imediatamente analisadas por citometria de fluxo após o tempo de incubação. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares e fenotípicas desejadas. Todos os anticorpos monoclonais utilizados foram obtidos

da Pharmingen (BD PharMingen, San Jose, CA, USA). As lectinas utilizadas para verificar o perfil glicofenotípico dos linfócitos T foram obtidas da Vector (Vector, USA). Os dados foram analisados no programa WinMDI versão # 2,8.

3.7. Histopatologia

O coração foi removido, embebido em meio de congelamento tissular (Tissue Tek, USA), seccionado com o auxílio de um criostato em cortes de 6 μm , que foram colocados em lâminas contendo poli-L-lisina e fixados durante 20 min em formol tamponado pH 7,2. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas em microscópio óptico de campo claro para a avaliação de parâmetros parasitológicos (dos Santos *et al.*, 2001). Foram analisados, pelo menos, 100 campos de quatro animais em cada grupo (1 campo = 0.159 mm^2) em microscópio de campo claro, num aumento de 400x, sendo quantificado o número de células inflamatórias, bem como o número de ninhos de amastigota por campo.

3.8. Imunohistoquímica

As análises imunohistoquímicas foram realizadas como descrito por Gonçalves e colaboradores (2006). O coração foi removido, embebido em meio de congelamento tissular (Tissue Tek, USA), seccionado com o auxílio de um criostato em cortes de 6 μm . Os cortes foram colocados em lâminas contendo poli-L-lisina e fixados com acetona durante 20 min. Posteriormente, os cortes foram lavados 5 vezes com PBS e bloqueados com Fc block (PBS suplementado com BSA, 5 % final) durante 20 min. As lâminas foram incubadas *overnight* com anticorpos monoclonais anti-mouse direcionados contra marcadores de células T ($\alpha\text{-CD4}^+$ e $\alpha\text{-CD8}^+$ - BD PharMingen, San Jose, CA, USA). Posteriormente, as

lâminas foram lavadas com PBS-Tween, 0,25 % e incubadas com anticorpos biotinilados anti-IgG de rato (Vector, USA) por 60 min. Após 10 min de lavagem com PBS foi feita a incubação por 45 minutos com estreptoavidina conjugada à peroxidase (Vector, USA), seguido-se de lavagem com PBS por 10 minutos. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB). As análises imunohistoquímicas foram realizadas como descrito acima, pela contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ infiltrantes do tecido cardíaco em todos os grupos experimentais decritos no item 3.4.

3.9. Parasitemia e mortalidade

A contagem de tripomastigotas sanguíneos em todos os experimentos foi realizada do 6º ao 10º dpi, pelo método de Pizzi-Brenner, sendo observada e quantificada, diariamente, a mortalidade cumulativa dos camundongos durante a infecção (Saraiva *et al.*, 2002).

3.10. Bioquímica sérica

Utilizamos a atividade da creatina quinase sérica, isotipo cardíaco (CK - MB) como indicativo da destruição de fibras cardíacas (de Souza *et al.*, 2000). A enzima catalisa a fosforilação da creatina, gerando fosfocreatina e ADP além de outros produtos finais como D-ribose-5-Fosfato, CO₂ e NADPH. O aumento dos níveis de NADPH foi determinado em espectrofotômetro num comprimento de onda de 340 nm. As leituras foram feitas com 5 µl de plasma de cada camundongo associado a 125 µl do reagente de trabalho fornecido pelo fabricante (Merck Labs). O plasma dos animais foi coletado no 8º e 15º dpi, e o grau da

lesão no tecido cardíaco dos animais infectados foi determinado pelo aumento da atividade CK quando comparado a atividade obtida nos animais normais.

3.11. PCR em tempo Real

A quantificação do DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco de camundongos Balb/c infectados foi realizada utilizando-se a técnica de PCR em tempo real conforme descrito anteriormente (Cummings & Tarleton, 2003). As curvas-padrão foram confeccionadas utilizando-se o DNA de *T. cruzi* (American Type Culture Collection - 30266D).

O DNA genômico foi obtido a partir da digestão de fatias finas (2 mm) do tecido cardíaco dos animais infectados. O tecido foi dissolvido com 150 µl de tampão de lise alcalina (NaOH 25 mM, Na₂-EDTA 2 H₂O 0,2 mM) após aquecimento a 95 °C por 1 h. Posteriormente, o material foi resfriado durante 20 min a 4 °C, sendo adicionado 150 µl do tampão de neutralização (Tris-HCl 40 mM) para cada amostra. As amostras foram centrifugadas a 8500 xg durante 20 min e o sobrenadante contendo o DNA total foi dosado em espectrofotômetro GeneQuant RNA/DNA Calculator (Biochrom, RU) a 260 e 280 nm, após diluição 1:1000. As reações foram feitas utilizando-se 0,1 µg de DNA total de cada amostra, calculado a partir da seguinte equação:

$$[\text{DNA}] = \frac{\text{leitura em 260nm} \times 50 \times \text{fator de diluição}}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

As reações foram realizadas em placas de 96 poços- *MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode*, cobertas com adesivos ópticos- *Optical adhesive Covers* (Applied Biosystems, RU) e processadas pelo *ABI Prism 7900 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, RU) do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB-UFMG.

As curvas–padrão atuaram como controles positivos de cada placa e dois poços contendo água destilada ao invés de DNA de *T. cruzi* foram os controles negativos.

As condições ótimas da PCR foram as seguintes: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95° C por 15 seg e 60° C por 1 minuto (Murta *et al.*, 2006). Ao final das reações, a temperatura da máquina foi elevada gradualmente, até que todas as fitas duplas de material amplificado se dissociassem.

As reações foram feitas em um volume final de 25 µl contendo: 5 µl de DNA total (0.1 µg); 2,5 µl de Syber buffer 10×; 3 µl de MgCl₂ 25 mM; 2 µl de dNTP (10 mM) e 0,1 µl de AmpliTaq Gold® 5 U/µl, 1,0 µl dos primers forward e reverse, específicos para mini-círculos de *T. cruzi*. (Applied Biosystems, RU). O volume final foi completado com água livre de RNase/DNase. Os primers utilizados foram os seguintes: Forward (GCTCTTGCCCACAMGGGTGC), sendo M = A ou C (S35-forward) e reverse (CCAAGCAGCGGATAGTTCAG) (S36-reverse).

Para a quantificação do número de moléculas de cDNA nas amostras em estudo, foi usado o programa *Sequence Detection System*, que determina para cada poço o número de ciclos em que a fluorescência cruza uma linha limiar arbitrária chamada *threshold* (Ct). Por comparação ao Ct das amostras com concentrações conhecidas da curva-padrão, o programa automaticamente calcula o número de moléculas nas amostras desconhecidas.

3.12. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A indução e quantificação da atividade citotóxica *in vitro* foi realizada utilizando células T CD8⁺ específicas para o peptídeo IYNVGQVSI, presente em proteínas pertencentes a família da TS, que sabidamente apresenta uma imunodominância durante a infecção chagásica experimental (Martin *et al.*, 2006). Este peptídeo foi gentilmente cedido pelo professor Maurício Martins Rorigues da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As células T CD8⁺ foram purificadas de acordo com as instruções descritas (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) a partir de esplenócitos totais de camundongos Balb/c infectados ou não com o *T. cruzi* (cepa Y). No 15º dpi, os eritrócitos foram depletados utilizando o tampão de lise (0.15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0.1mM Na EDTA, pH 7.2-7.3). Frações enriquecidas de células T foram obtidas a partir da passagem de esplenócitos de camundongos infectados ou não em colunas de nylon como descrito previamente (Freire-de-Lima *et al.*, 2000). As células T CD4⁺ e os linfócitos B foram depletados por seleção negativa usando α -CD4⁺ e α -B220⁺ marcados com FITC (BD PharMingen, San Jose, CA, USA) em associação com partículas magnéticas conjugados com α -FITC (Miltenyi Biotec). As células T CD8⁺ foram então purificadas da fração não ligada por seleção negativa. O grau de pureza foi superior a 98 %, sendo quantificado por citometria de fluxo como descrito no item 3.5 utilizando o anticorpo monoclonal α -CD8-APC. Parte das células T CD8⁺ ($2,0 \times 10^7$) purificadas de camundongos infectados (PNA^{high}) tornaram-se PNA^{low} a partir da resialilação usando fetuína (0.1 mg/mL⁻¹) como molécula doadora de ácido siálico na presença de 0.05 unidades da TSa durante 30 min a 37° C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e o glicofenótipo foi verificado por citometria de fluxo utilizando a lectina PNA como descrito acima.

Células da linhagem A2OJ foram utilizadas como células alvo. Tais células foram divididas em 2 populações e marcadas com o corante vital CFSE (Molecular Probes) nas concentrações de 1,0 e 10 μM durante 15 minutos a 37° C em PBS pré-aquecido. A população marcada com 10 μM tornou-se população alvo após ser pulsada com 2,0 μM do peptídeo IYNVGQVSI por 40 min a 37° C. As células pulsadas com 1,0 μM foram utilizadas como população controle. Tais células foram incubadas em placas de 24 poços em R10 numa concentração de 2×10^5 células por poço (1×10^5 CFSE^{low}/ 1×10^5 CFSE^{high}) durante 24 horas na presença de células T CD8⁺ de camundongos não infectados (PNA_{low}), infectados (PNA^{high}) ou resialilados (PNA^{low}). O volume final de cada poço foi de 0,5 mL⁻¹. Este experimento foi realizado utilizando diferentes proporções de células alvo (10 μM CFSE + peptídeo) e células T CD8⁺ respondedoras (1:1; 1:10; 1:20 e 1:30). Após 20 h, as células foram coletadas e fixadas com PFA 1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Após uma lavagem com PBS, as células foram então ressuspensas em PBS suplementado com 3% de SFB. As populações de linfócitos CFSE^{low} e CFSE^{high} foram detectadas via citometria de fluxo, usando o FACScalibur (Becton e Dieckson) e analisadas com o software WinMDi versão # 2,8. A porcentagem de lise específica para o peptídeo foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % de lise = $1 - (\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ infectado} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ infectado}) / (\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ normal} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ normal}) \times 100$.

3.13. Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado conforme descrito previamente (Tzelepis *et al.*, 2008). Suspensões de células foram preparadas do baço de camundongos Balb/c normais. Os eritrócitos foram lisados usando tampão de lise (0.15M NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0.1Mm Na EDTA, pH 7.2-7.3). Depois de duas

lavagens com RPMI, as células foram ressuspensas em R10. A viabilidade das células foi avaliada utilizando o corante Azul de Tripán (0.01% final) como discriminante entre células vivas e mortas. A concentração das células foi estimada em câmara de Neubauer. Metade dos esplenócitos foram corados com 1 μ M (CFSE^{low}) e a outra metade com 10 μ M (CFSE^{high}) de CFSE (Molecular Probes) como descrito no item anterior. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em R10 e as células alvo (CFSE^{high}) foram pulsadas com 2,0 μ M do peptídeo IYNVGQVSI como descrito acima. Ambas populações de CFSE foram misturadas na concentração de 1:1, centrifugadas a 270 xg, ressuspensas em RPMI e injetadas intravenosamente (via retro-orbital) em camundongos BALB/c infectados e tratados ou não com a Tsa e TSi, numa concentração de 1-2 x10⁷ células/camundongo. Depois de aproximadamente 20 h, o baço dos camundongos que receberam as células marcadas foi retirado e as suspensões de células fixadas em PBS contendo paraformaldeído 1% por 5 min. Após uma lavagem com PBS, as células foram adquiridas usando o FACScalibur (Becton e Dieckson) e analisadas com o software WinMDi versão # 2,8. A porcentagem de lise específica para o peptídeo foi determinada como descrito acima

3.14. Elisa para detecção de IL-4 e INF- γ em culturas de células T esplênicas

Placas de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com 100 μ l/ poço (4 μ g/mL) dos anticorpos de captura (Santa Cruz) e incubadas *overnight* a 4° C. Os poços foram lavados 2 vezes com PBS pH 7,2; TWEEN-20 0,025 % (PBS/ TWEEN) e bloqueados com PBS suplementado com 10% de SFB (PBS/ 10 % SFB) num volume de 200 μ l/ poço. As placas foram deixadas em repouso por 2 h a 37° C e lavadas 3 vezes com PBS/ TWEEN. Posteriormente, foram adicionados aos poços, os padrões diluídos em PBS/ 10% SFB e 50 μ l dos sobrenadantes das culturas de células T esplênicas dos grupos N,

INF, ITSi, ITSa, ITSa/ITSi (1:1) e ITSa/ITSi (1:3), que foram purificadas como descrito previamente (Freire-de-Lima et al., 2000). As placas foram cobertas e incubadas *overnight* a 4° C. Após lavar as placas 4 vezes com PBS/ TWEEN, 100 µl (4 µg/ mL), os anticorpos de detecção (Santa Cruz) foram adicionado aos poços. As placas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente e lavadas 6 vezes com PBS/ TWEEN. Posteriormente, foram adicionados em cada poço 100 µl de estreptoavidina-fosfatase alcalina (1 µg/mL) diluída em PBS suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas por 3 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas 8 vezes com PBS/TWEEN e foram adicionados em cada poço, 100 µl da solução 1,0 mg/mL do substrato ácido bis-azina etil benzotiazolino sulfônico (Sigma) diluído em em Tris 20 mM, MgCl₂ 100 mM. As leituras foram realizadas em leitor Beckman Coulter AD 340 com filtro de 405 nm.

4. Resultados

4.1. Obtenção das formas ativa (TSa) e inativa (TSi) da *trans*-sialidase do *T. cruzi*

Os efeitos da TS em células T foram estudados utilizando ambas as formas da enzima recombinante contendo a porção SAPA no C terminal, obtidas a partir de *E. coli* (MC 1061) eletrotransformada, contendo o gene da TSa (TSREP.C no vetor TrcHisA) ou da TSi (Tyr342-His no vetor TrcHisA). A figura 7 mostra a pureza das proteínas recombinantes, sendo observada uma banda característica de 90 kDa referente às enzimas, em gel de poliacrilamida 12 % sob condições desnaturantes.

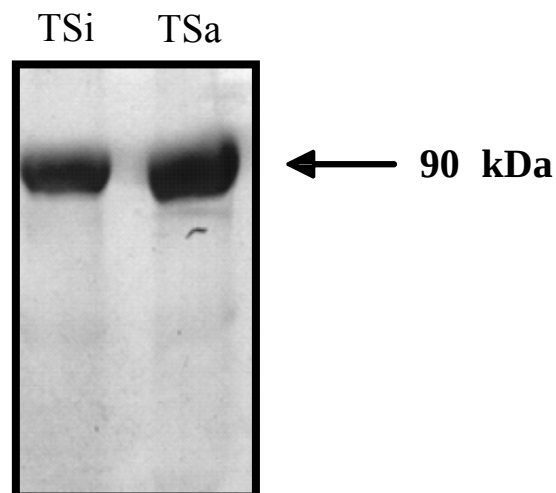


Figura 7. SDS-PAGE da TSa e TSi recombinante. A enzima foi purificada conforme descrito em materiais e métodos, e 10 µg de proteína foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE 12 % e corada com Coomassie Blue. P: padrão de massa molecular, as setas indicam os marcadores de massa molecular.

4.2. Efeitos da TSa e TSi na parasitemia e sobrevida de camundongos infectados pelo *T. cruzi*

Visando avaliar o efeito da TSa e TSi durante a infecção pelo *T. cruzi*, camundongos Balb/c foram tratados com a TSa (ITSa) ou TSi (ITSi), e infectados com 10^4 tripomastigotas sanguíneos (cepa Y). O grupo somente infectado (INF) recebeu PBS, que foi o veículo de administração da enzima por via endovenosa. A figura 8 mostra que no 8º dia pós infecção (dpi) foi observado um aumento significativo no número de tripomastigotas sanguíneos no grupo ITSa (Fig. 8A, barras pretas), quando comparado ao grupo INF (Fig. 8A, barras brancas). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos INF e ITSi (Fig. 8A, barras riscadas). Além disso, camundongos ITSa apresentaram morte precoce quando comparado aos camundongos do grupo INF (Fig. 8B). De maneira surpreendente, os animais do grupo ITSi apresentaram a meia vida aumentada em relação ao grupo INF (Fig. 8B). Em 1995, Chuenkova & Pereira, também demonstraram que a administração de anticorpos monoclonais direcionados contra a porção N-terminal, onde está localizado o domínio catalítico da enzima diminuiu, significativamente, a invasão do parasita além de aumentar a sobrevida dos camundongos infectados. Desta maneira, os resultados obtidos com a TSi (Fig. 8, barras riscadas) estão de acordo com os dados descritos por Chuenkova e Pereira (1995), confirmando que a atividade enzimática de proteínas pertencentes a família TS está diretamente relacionada a sua virulência.

TSa e TSi apresentam sítios conservados de ligação para $\alpha 2$ -3 AS e β Galp (Cremona *et al.*, 1999; Todeschini *et al.*, 2004), sugerindo que ambas proteínas poderiam competir *in vivo* pelos mesmos sítios de ligação durante a infecção chagásica experimental. Para testarmos esta possibilidade, analisamos os efeitos biológicos desencadeados quando a TSa e TSi são administradas juntamente durante a infecção

pelo *T. cruzi in vitro* e *in vivo*. Como pode ser observado na figura 9, quando a TSi foi co-injetada na mesma concentração que a TSa (1:1), o efeito biológico desencadeado pela atividade enzimática observado anteriormente (Fig. 8 A) foi comprometido (Fig. 9 A). Além disso, no 8º dpi, a secreção espontânea de citocinas (IL-4 e INF- γ) por células T esplênicas no grupo tratado com TSi e TSa (1:1) retornou ao padrão normal observado no grupo INF.

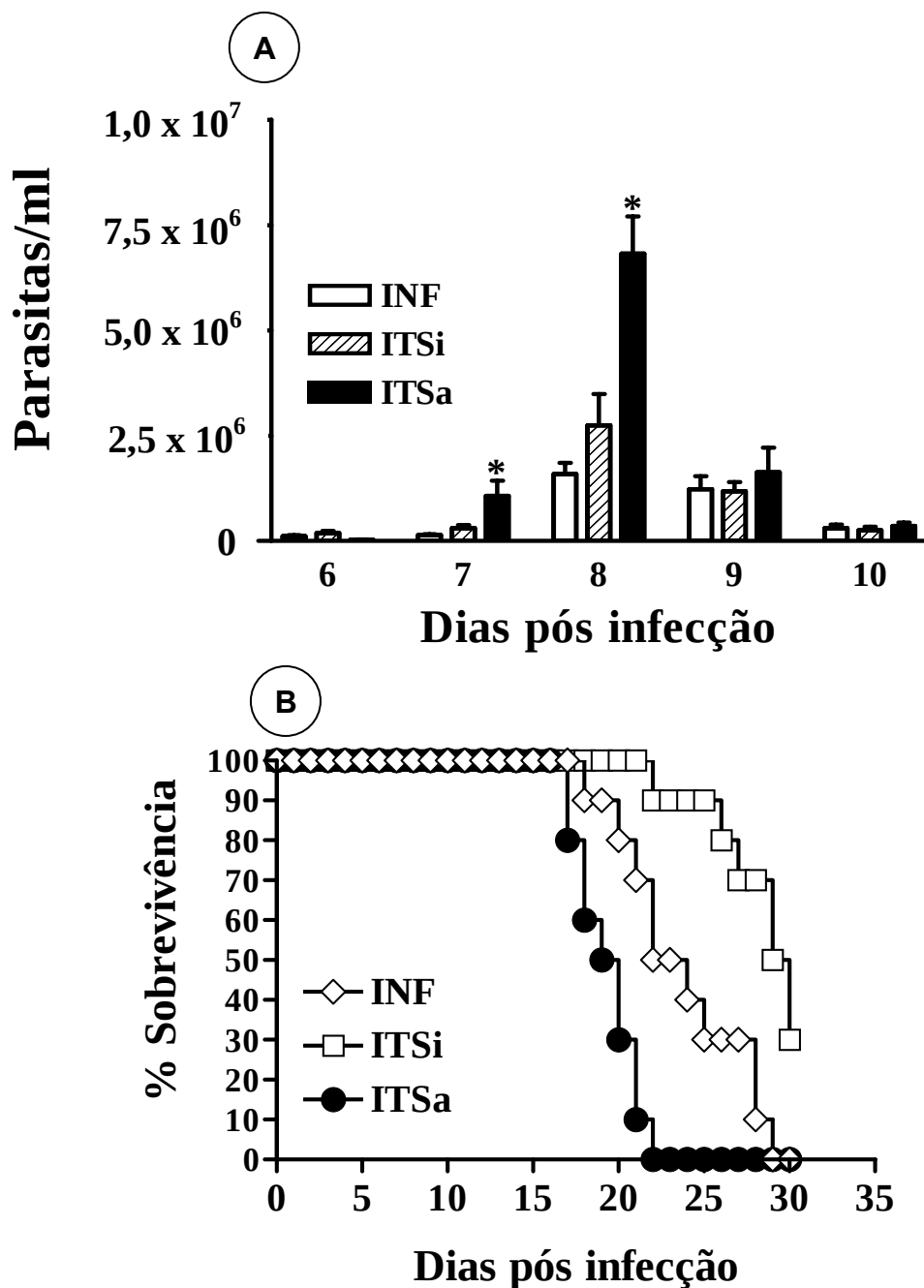


Figura 8. TSa aumenta a virulência do *T. cruzi* em camundongos Balb/c infectados. Grupos de 10 animais foram tratados com 30 µg de TSi (barras riscadas) ou TSa (barras negras) 1 hora antes da infecção, assim como nos dias 1 e 2 pós-infecção. O grupo não tratado (barras brancas) recebeu 100 µl de PBS por via endovenosa, uma vez que este foi o veículo de administração das enzimas. (A) A parasitemia foi quantificada pelo método de Pizzi e Brener do 6º ao 10º dia (*, valores significativos em relação aos grupos INF e ITSi, $p < 0.05$). Figura representativa da média de 5 camundongos por grupo. (B) A sobrevivência dos camundongos INF (◇), ITSi (□) e ITSa (●) foi acompanhada até o 30º dpi. Figura representativa de 10 camundongos por grupo.

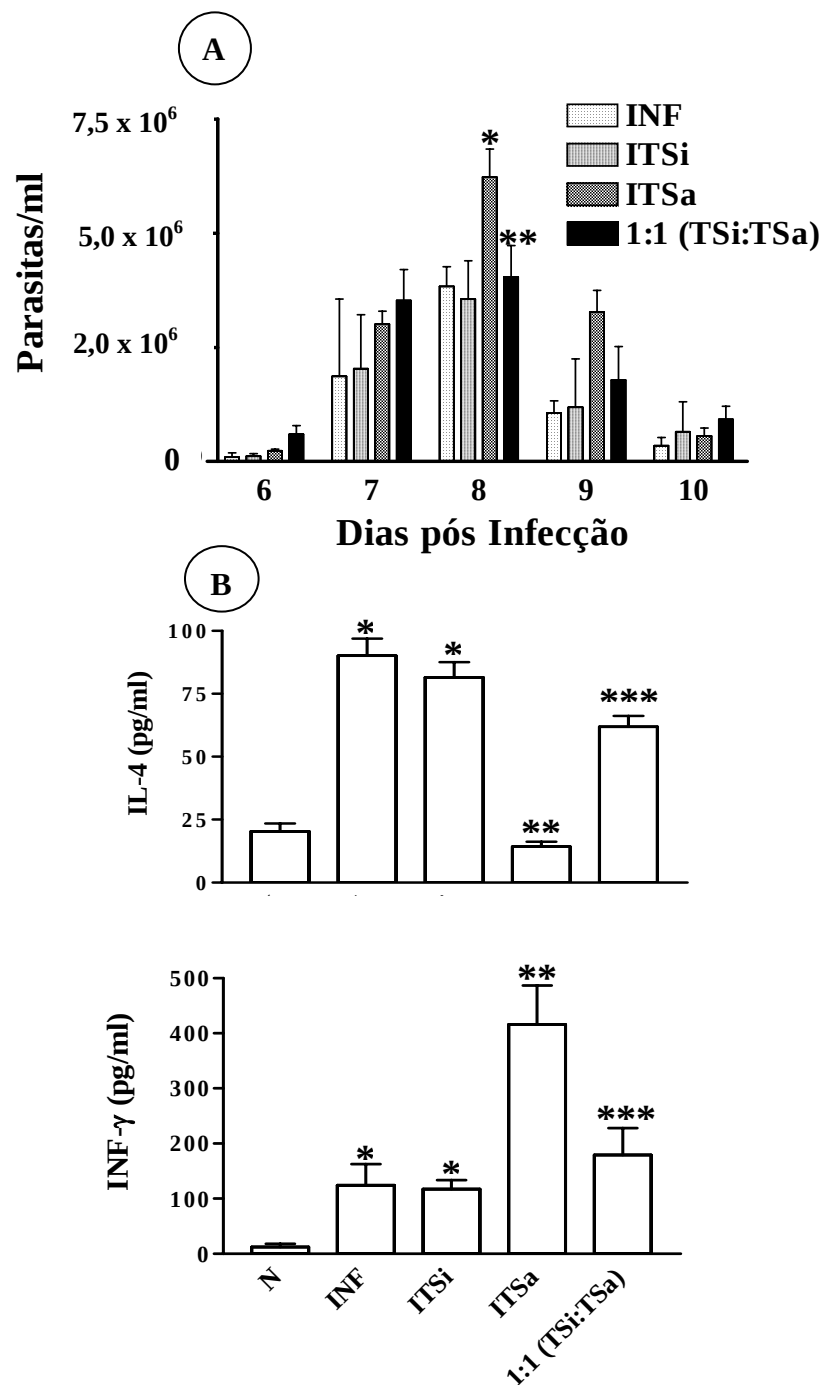


Figura 9. A TSi reverte os efeitos induzidos pela TSa. Camundongos Balb/c foram infectados e tratados com PBS (INF) ou com TSi (ITSi) ou TSa (ITSa) como descrito nos materiais e métodos. (A), A parasitemia foi realizada do 6º ao 10º dpi (* valores significativos em relação aos grupos INF e ITSi, $p < 0.05$); (**, valores significativos em relação ao grupo ITSa, $p < 0.05$). Figura representativa da média de 6 camundongos por grupo. (B), No 8º dpi, parte dos camundongos foi sacrificado e a secreção espontânea de citocinas (IL-4 e INF- γ) por células T esplênicas foi acessada por ELISA (*, valores significativos em relação ao grupo N, $p < 0.05$); (** valores significativos em relação aos grupos INF e ITSi, $P < 0.01$); (***, valores significativos em relação ao grupo ITSa, $p < 0.01$). Figuras representativas da média de 3 camundongos por grupo.

4.3. Efeitos da TSi e TSa na carga parasitária do tecido cardíaco de camundongos infectados pelo *T. cruzi*

Os ensaios histopatológicos revelaram que o tratamento de camundongos normais com a TSa (NTSa) e TSi (NTSi) não comprometeu a viabilidade do tecido cardíaco. Nestes grupos, o tecido cardíaco de cada animal apresentou sua característica típica, com a presença de raros leucócitos infiltrantes (dados não mostrados). Contudo, entre os grupos infectados (Fig. 10 A) foi possível observar um aumento significativo no número de ninhos de amastigota (setas) por área ($0,159 \text{ mm}^2$) no grupo ITSa, quando comparado aos camundongos dos grupos INF e ITSi (Fig. 10 A). O gráfico embutido na figura 10 A ilustra o número de ninhos de amastigota quantificados no tecido cardíaco dos grupos experimentais. Como pode ser observado (gráfico, Fig. 10 A), o tecido cardíaco do grupo ITSa (barras pretas) apresentou 3,6 vezes mais ninhos de amastigota, do que o grupo INF (barras brancas). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos INF (barras brancas) e ITSi (barras riscadas). As análises realizadas pela técnica de real time PCR corroboraram os dados de parasitemia e histopatologia, sendo observado uma maior concentração de DNA parasitário no tecido cardíaco dos animais ITSa (Fig. 10 B, barras pretas). Não houve diferença significativa entre os grupos INF (Fig. 10 B, barras brancas) e ITSi (Fig. 10 B, barras riscadas).

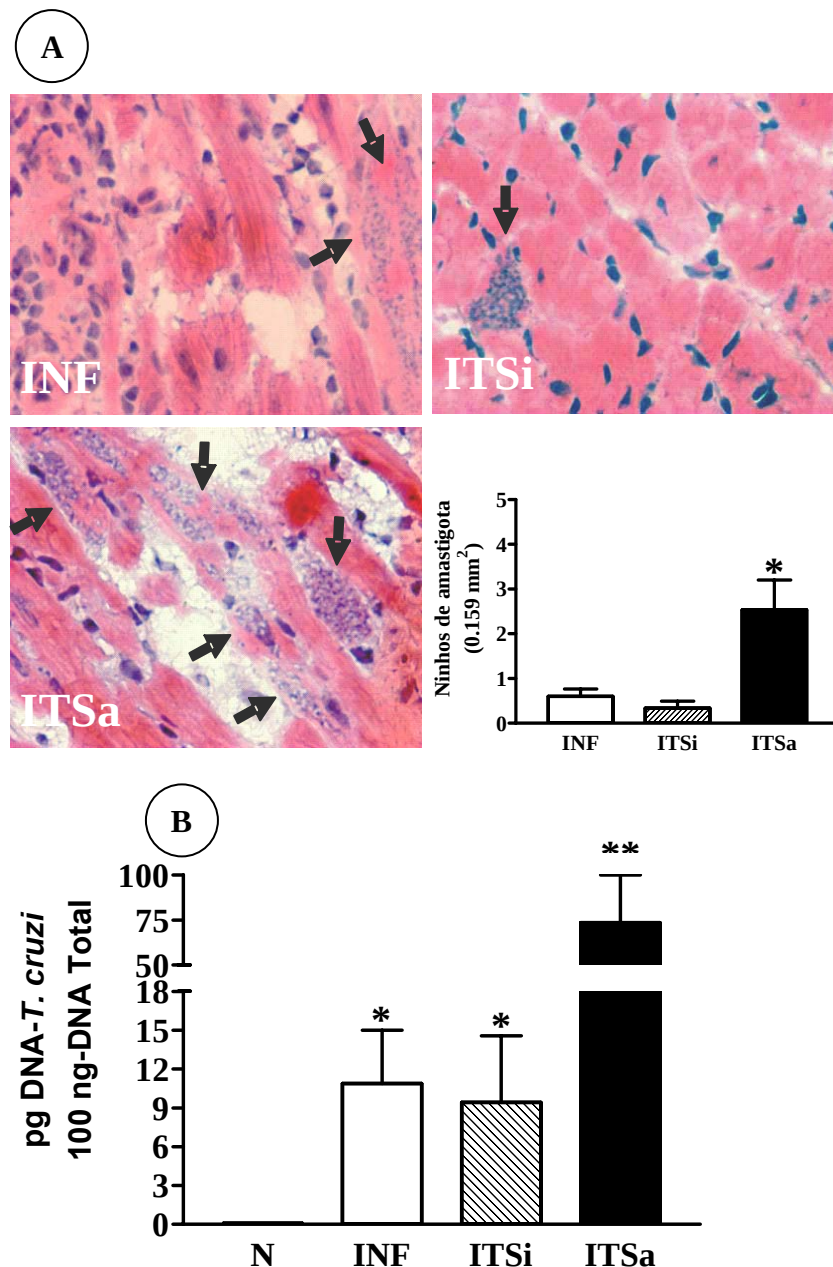


Figura 10. Camundongos infectados e tratados com TSa apresentam um aumento no número de ninhos de amastigota por área e maior concentração de DNA do *T. cruzi* no tecido cardíaco. Camundongos Balb/c foram infectados, e tratados com PBS (INF) ou com TSi (ITSi) ou TSa (ITSa) como descrito nos materiais e métodos. (A) No 15º dpi, metade do tecido cardíaco foi processado para a realização de análises histopatológicas, visando quantificar o número de ninhos de amastigota (setas) (*, valores significativos em relação aos grupos INF e ITSi, $p < 0.05$) Figura representativa da média de 7 camundongos por grupo. (B) A outra metade do tecido cardíaco foi digerida com solução de lise alcalina para a obtenção do DNA genômico total, que foi utilizado em reações de real time PCR para quantificar a concentração de DNA parasitário no tecido cardíaco de cada grupo experimental (*, valores significativos em relação ao grupo N, $p < 0.05$) (**, valores significativos em relação aos grupos INF e ITSi, $p < 0.01$). Figura representativa da média de 3 camundongos por grupo.

4.4. Avaliação dos efeitos da TSa e TSi no tráfego de células T *in vivo*

Visando evidenciar os efeitos desencadeados pela TSa e TSi no tráfego de células T para o tecido cardíaco, camundongos Balb/c normais e infectados foram tratados com PBS (N, INF) ou com TSi (NTSi, ITSi) ou TSa (NTSa, ITSa), e o grau de infiltração de ambas as populações de células T foi avaliado por imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais direcionados contra células T CD4⁺ e T CD8⁺. A figura 11 A ilustra as marcações para células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos grupos INF, ITSi e ITSa. Como pode ser observado, o tecido cardíaco do grupo ITSi, mas não ITSa apresentou uma redução marcante no número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ quando comparado aos grupos INF e ITSa (Fig. 11 B). Esses valores foram obtidos a partir da contagem de 100 campos (0,159 mm²) de cada animal em cada grupo experimental. Nenhuma alteração foi observada entre os camundongos dos grupos N, NTSi e NTSa (dados não mostrados). A hipótese de que a TSi estaria comprometendo o tráfego de células T para o tecido cardíaco de camundongos infectados foi fortificada pelos dados obtidos durante as análises realizadas por citometria de fluxo (Fig. 12), uma vez que, o grupo ITSi apresentou uma redução marcante do número absoluto de ambas populações de células T infiltrantes no tecido cardíaco (Fig. 12 B e 12 C). Esse fenômeno pode ser observado com mais clareza na figura 11 D, onde se observa uma redução considerável do número de células presentes na região específica de linfócitos no grupo ITSi, quando comparado aos grupos INF e ITSa (Fig. 11 D). Contudo, nenhuma alteração no percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi observada entre os grupos estudados (Fig. 12 A).

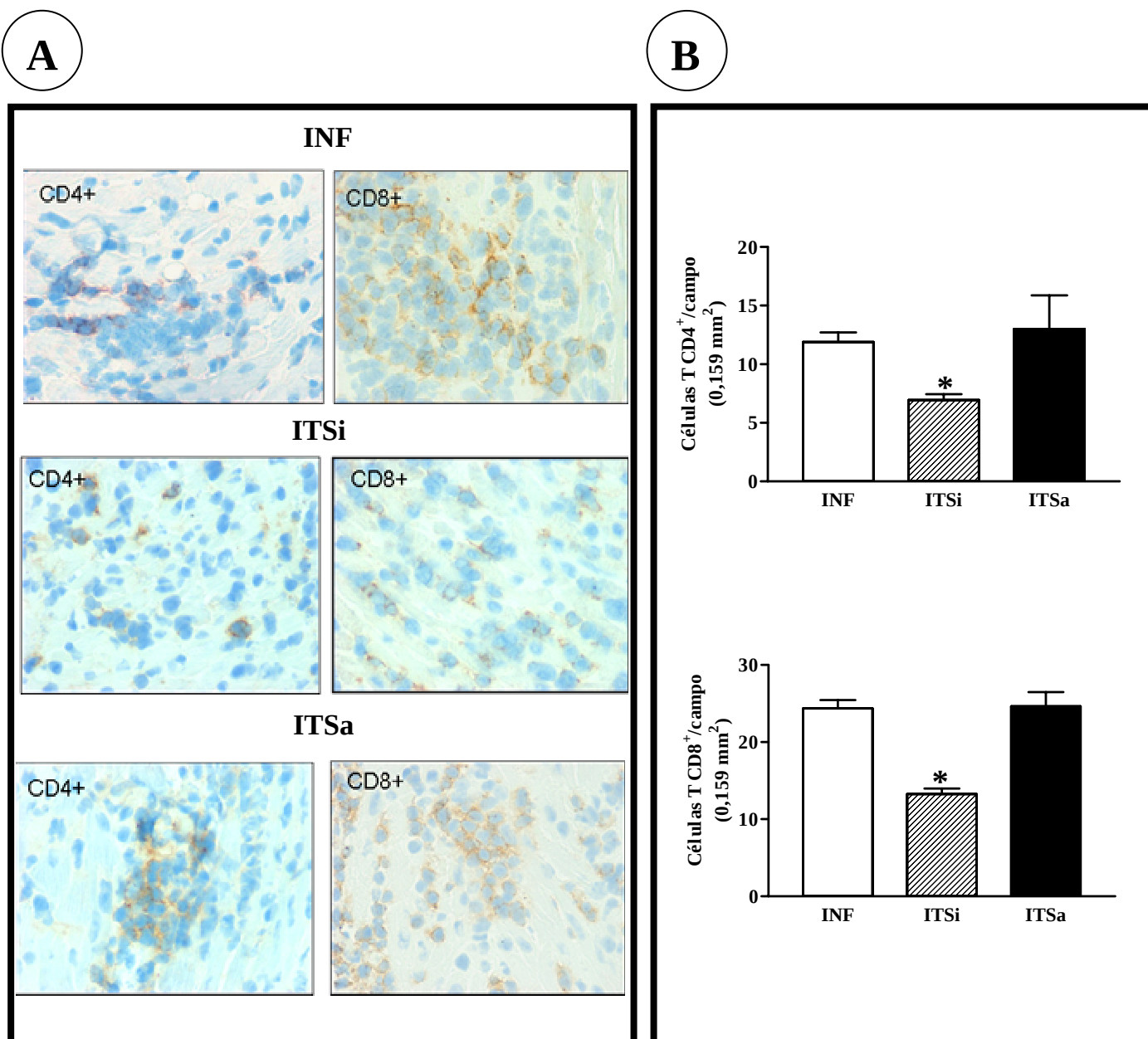


Figura. 11: A TSi compromete o tráfego de células T CD4⁺ e T CD8⁺ para o tecido cardíaco de camundongos infectados. Camundongos Balb/c foram infectados e tratados com PBS (INF) ou com TSi (ITSi) ou TSa (ITSa). (A) No 15º dpi, o tecido cardíaco dos animais de cada grupo experimental foi processado para a realização de análises imunohistoquímicas, utilizando anticorpos monoclonais direcionados contra células TCD4⁺ e TCD8⁺. (B) Média de células TCD4⁺ e TCD8⁺ obtidas a partir da contagem de 100 campos (0,159 mm²) capturados de maneira aleatória (*, valores significativos em relação aos grupos INF e ITSa, $p < 0.05$).

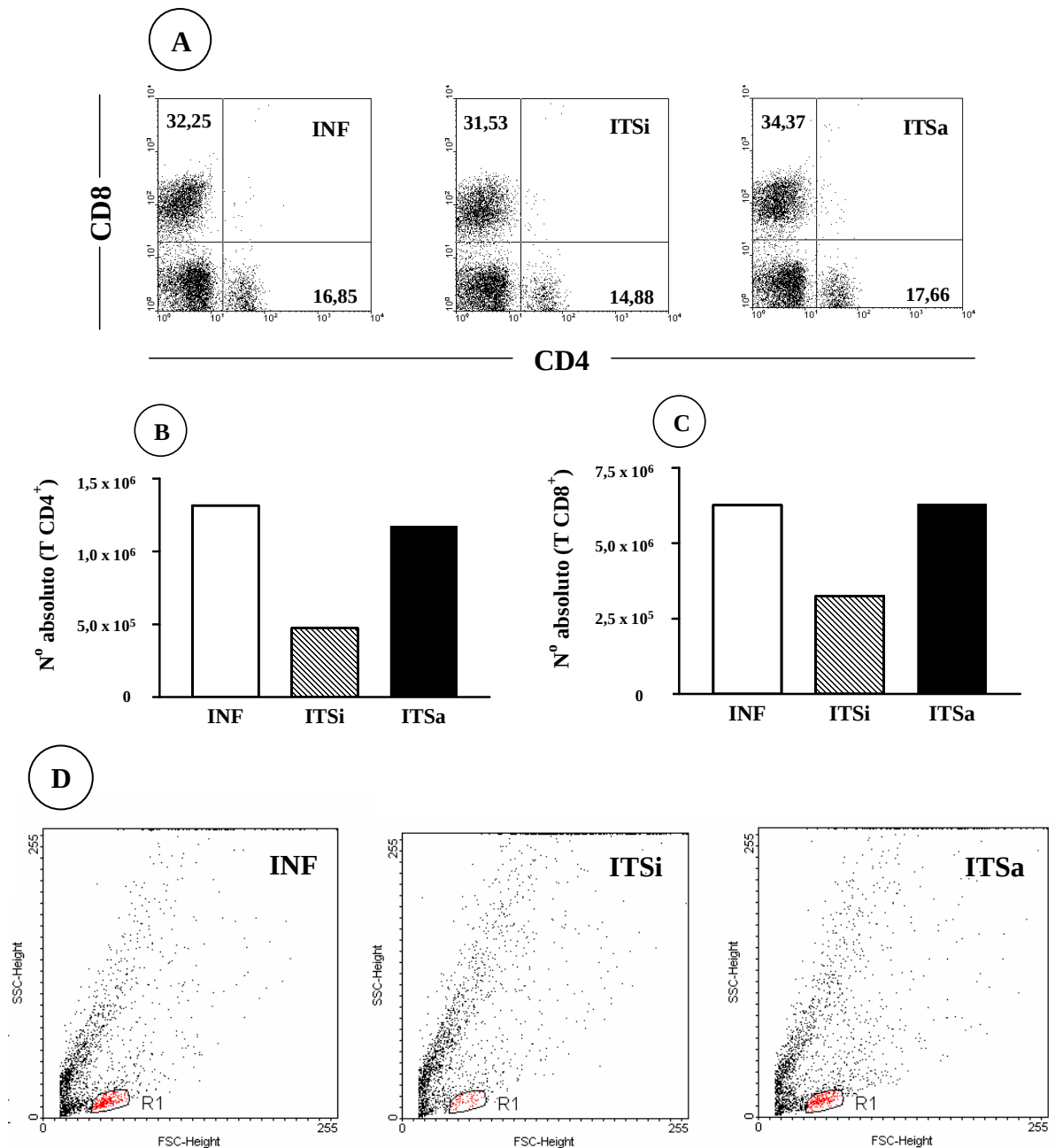


Figura 12. Camundongos ITSi apresentam uma redução do número absoluto de células T infiltrantes no tecido cardíaco. Camundongos infectados foram tratados com PBS (INF) ou com TSi (ITSi) ou TSa (ITSa). No 15º dpi, os animais foram sacrificados e o tecido cardíaco digerido com collagenase IV (0,2 %) para a obtenção dos leucócitos infiltrantes. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais fluorescentes direcionados contra células T CD4⁺ e T CD8⁺, sendo o percentual (A) e o número absoluto de células T CD4⁺ (B) e T CD8⁺ (C) determinados por citometria de fluxo. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares desejadas. A figura D ilustra a região de linfócitos (R1) referente aos grupos infectado (INF), infectado tratado com TSi (ITSi) e infectado tratado com TSa (ITSa).

4.5. Efeito da TSi e TSa no dano de fibras cardíacas em camundongos infectados

Na tentativa de avaliar o grau de destruição das fibras cardíacas, camundongos Balb/c foram divididos em 6 grupos (N, NTSi, NTSa, INF, ITSi e ITSa), e a atividade plasmática da creatina cinase (CK) foi verificada no 8º e 15º dia experimental. No 8º dpi, não foi possível detectar nenhuma diferença na atividade CK entre os grupos normais (N, NTSi e NTSa) e infectados (INF, ITSi e ITSa) (dados não mostrados). Todavia, como pode ser observado na figura 13, no 15º dia, o grupo ITSi apresentou uma redução marcante desta atividade quando comparado aos grupos INF e ITSa, justificando os resultados obtidos durante as análises realizadas por citometria de fluxo (Fig. 12) e imunohistoquímica (Fig. 11), onde foi observado uma redução do número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ infiltrantes no tecido cardíaco dos camundongos ITSi. Após 15 dias de tratamento, nenhuma diferença significativa da atividade CK foi observada entre os grupos N, NTSi e NTSa (Fig. 13).

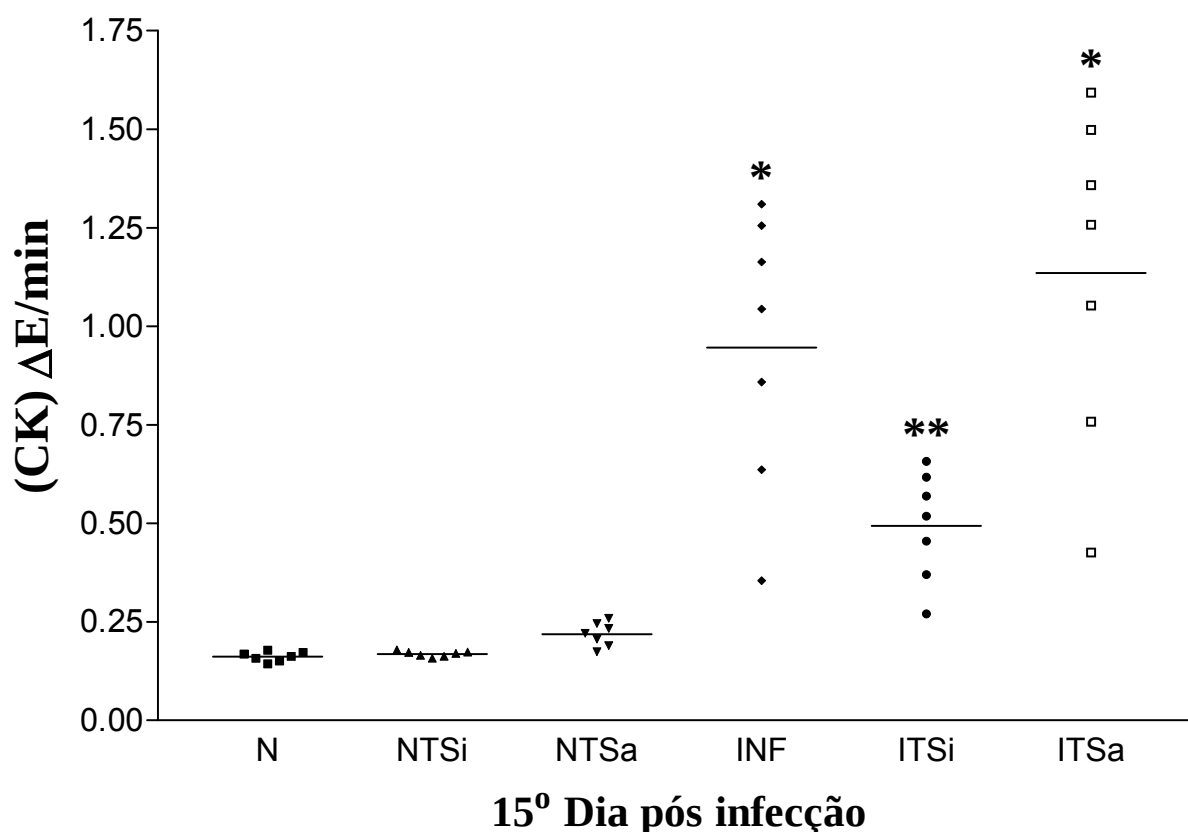


Figura 13. Camundongos Balb/c infectados apresentam uma diminuição da atividade plasmática da CK após o tratamento com TSi. As análises obtidas por citometria de fluxo e por imunohistoquímica revelaram que camundongos infectados tratados com a TSi apresentaram uma redução do número de células inflamatórias no tecido cardíaco quando comparado aos grupos I e ITSa. Para validar esta hipótese, o aumento da atividade CK (indicativo da destruição de fibras cardíacas) foi verificado nos grupos: normal (N), normal tratado com TSi (NTSi), normal tratado com TSa (NTSa) infectado (INF), infectado tratado com TSi (ITSi) e infectado tratado com TSa (ITSa). No 15º dpi os camundongos de cada grupo experimental foram sacrificados e o plasma, obtido após a centrifugação (1500 xg) do sangue coletado por punção cardíaca, foi utilizado para a realização das reações em espectrofotômetro num comprimento de onda de 340 nm. As leituras foram feitas com 5 µl de plasma de cada camundongo associado a 125 µl do reagente de trabalho fornecido pelo fabricante (Merck Labs). O grau da lesão no tecido cardíaco dos animais infectados foi determinado pelo aumento da atividade CK quando comparado a atividade obtida nos animais normais. (*, valores significativos em relação aos grupos N, NTSi, NTSa e ITSi, $p < 0.01$). (**, valores significativos em relação aos grupos N, NTSi e NTSa, $p < 0.05$). Gráfico representativo da média de 7 camundongos por grupo.

4.6. Avaliação dos efeitos pró-apoptóticos da TSa em células T de camundongos deficientes para o ligante de FAS (FASL^{-/-})

Visando analisar o perfil de células T esplênicas nos grupos estudados (N, NTSi, NTSa, INF, ITSi e ITSa), as populações de leucócitos esplênicos foram marcadas com anticorpos direcionados contra células T CD4⁺ e T CD8⁺ e analisados por citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstraram que após 15 dias, não ocorreu alteração no percentual de ambas as populações de células T (CD4⁺/CD8⁺) entre os grupos normais (N, NTSi e NTSa) e infectados (INF, ITSi e ITSa) (Fig. 14 A), corroborando os dados já descritos na literatura (Gao *et al.*, 2002). Contudo, a injeção de TSa em camundongos normais (NTSa) promoveu a de-sialilação das glicomoléculas de superfície em células T, uma vez que tais células apresentaram-se mais sensíveis a marcação com PNA (Fig. 14 B) quando comparado as células T de camundongos não tratados (N). Como descrito previamente (Leguizamon *et al.*, 1999; Mucci *et al.*, 2002, 2005, 2006), após três dias de tratamento, a TSa induziu a apoptose de células T esplênicas em camundongos Balb/c selvagens (WT) (Fig. 15), um evento característico da fase aguda da infecção chagásica (Lopes *et al.*, 1995). Este fenômeno mostrou-se dependente da via clássica (FAS/FASL), uma vez que camundongos deficientes para o ligante de FAS (*gld*) mostraram-se resistentes ao tratamento com TSa (Fig. 15).

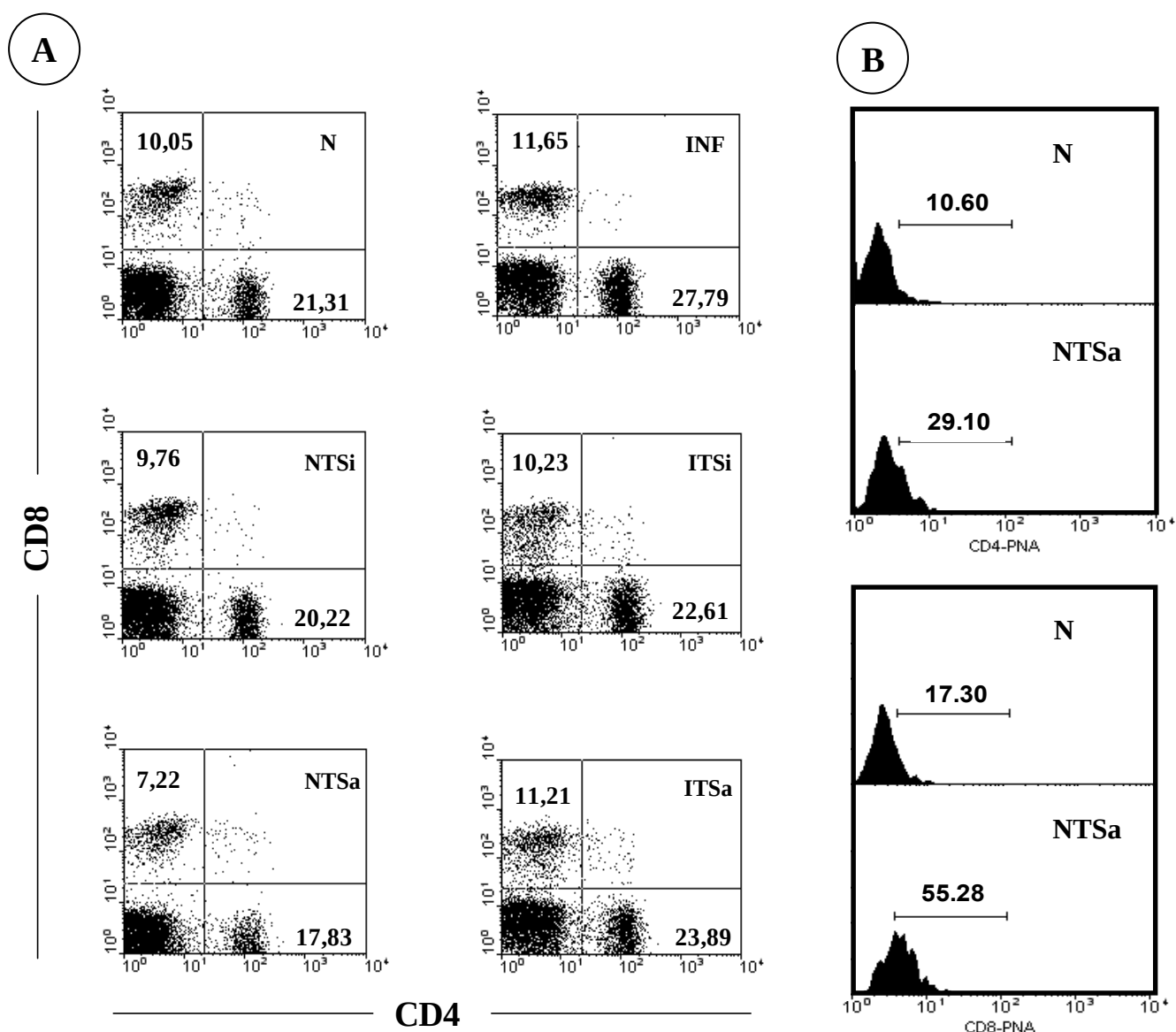


Figura. 14: TSi e TSa não alteram a percentagem de células T esplênicas em camundongos normais e infectados. Camundongos normais e infectados foram tratados com TSi (NTSi e ITSi) ou TSa (NTSa e ITSa). Os grupos controles (N, INF) foram tratados com PBS, que foi o veículo de administração das enzimas. No 15º dia, os camundongos foram sacrificados, os baços macerados e os leucócitos esplênicos totais obtidos após a lise das hemácias por choque hipotônico. Os leucócitos totais foram marcados com anticorpos monoclonais fluorescentes direcionados contra células T CD4⁺ e T CD8⁺ em associação com PNA como discriminante de células de-sialiladas. (A), percentual de células T em camundongos normais (N, NTSi e NTSa) e infectados (INF, ITSi e ITSa) tratados (NTSi e NTSa) ou não (N e INF) com TSi e TSa. (B), sensibilidade de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de camundongos normais tratados (NTSa) ou não (N) com TSa. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares e fenotípicas desejadas.

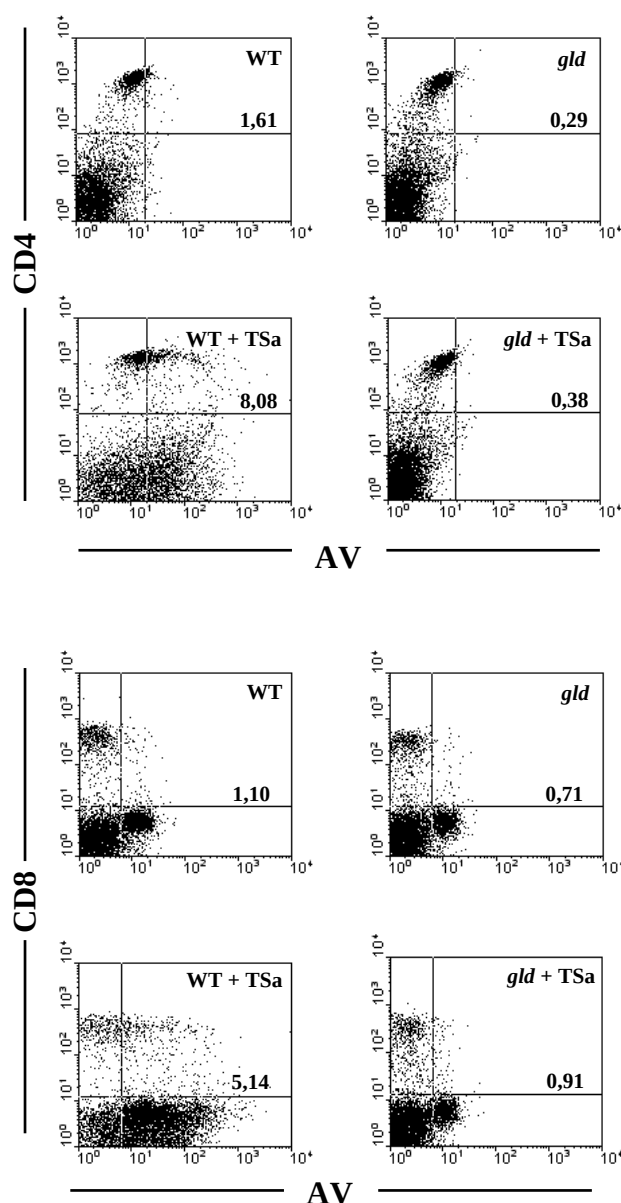


Figura 15. TSa induz a apoptose de células T CD4⁺ e T CD8⁺ esplênicas em camundongos Balb/c selvagens, mas não em animais deficientes para o ligante de FAS. Camundongos Balb/c selvagens (WT) ou deficientes para o ligante de FAS (*gld*) foram tratados com TSa (WT TSa, *gld* TSa) ou PBS (WT, *gld*) como descrito nos materiais e métodos. Após 72 horas de tratamento os camundongos foram sacrificados, os baços macerados e os leucócitos esplênicos totais obtidos após a lise das hemácias por choque hipotônico. A morte de células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi quantificada por citometria de fluxo, após a marcação dos esplenócitos totais com anticorpos monoclonais fluorescentes direcionados contra células T CD4⁺ e T CD8⁺ associados a Anexina-V-FITC, como discriminante de células apoptóticas. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares e fenotípicas desejadas. A percentagem de células positivas para Anexina-V em cada grupo experimental estão indicadas no respectivo quadrante. Figura representativa de 2 experimentos realizados com 3 camundongos por grupo.

4.7. Células T CD8⁺ de camundongos infectados e tratados com TSa apresentam um glicofenótipo PNA^{low}

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que após a ativação de células T, os linfócitos passam a apresentar um glicofenótipo PNA^{high}, devido a redução das atividades α 2-3 e α 2-6 ST (Comelli *et al.*, 2006; Amado *et al.*, 2004; Chervenak & Cohen, 1982). Baseado nestes dados seria plausível imaginar, que as asialoglicoproteínas presentes na superfície de células T ativadas poderiam atuar como aceptores de AS numa reação catalisada pela TS do *T. cruzi* presente no soro de indivíduos infectados. Como pode ser observado na figura 16, tanto no 8º (Fig. 16 A) quanto no 15º dpi (Fig. 16 B), enquanto grande parte da população de células T CD8⁺ de camundongos INF apresentavam um glicofenótipo PNA^{high} (histogramas pretos), as células T CD8⁺ de camundongos ITSa (histogramas cinzas) apresentavam níveis similares de marcação para PNA, quando comparados as células T CD8⁺ de camundongos não infectados (N) (PNA^{low}) (histogramas tracejados). Esse possível fenômeno de re-sialilação mostrou-se específico para células T CD8⁺, uma vez que nenhuma diferença marcante foi observada comparando os níveis de marcação para PNA entre células T CD4⁺ de camundongos INF e ITSa.

Na tentativa de determinar se a incorporação do AS ocorre na superfície de células T CD8⁺ ativadas, células T CD8⁺ de camundongos N, INF e ITSa foram purificadas no 15º dpi por seleção negativa como descrito no item 3.12 dos materiais e métodos, e incubadas com a lectina fluorescente MAA II e com o anticorpo monoclonal fluorescente direcionado contra o marcador de ativação CD44. Como esperado, enquanto as células T CD8⁺ de camundongos do grupo N apresentaram uma elevada marcação para a lectina MAA (66,09 %) e uma baixa expressão do marcador de ativação CD44 (25,03 %) (Fig. 17 A), as células T CD8⁺ de camundongos do grupo INF

apresentaram um aumento na expressão de CD44 (53,70 %) e uma redução considerável da marcação para MAA (21,80 %) (Fig. 17 A). Entretanto, corroborando os resultados obtidos pela marcação com a lectina PNA no 15º dpi (Fig. 16 B), os níveis de marcação para MAA em células T CD8⁺ de camundongos ITSa foram similares (69,51 %) aos observados em células T CD8⁺ de camundongos N (66,09 %). Além disso, continuaram expressando altos níveis de CD44 (51,46 %) (Fig. 17 A), um indicativo de que as células foram re-sialiladas e permaneceram ativadas.

Visando determinar um possível acceptor de AS na superfície das células T CD8⁺ de camundongos ITSa, foi utilizado o anticorpo monoclonal α CD43, clone S7, que reage com a isoforma de baixo peso molecular (115 kDa) sialilada com o α 2-3- AS. De maneira surpreendente, enquanto a marcação para α CD43 em células T CD8⁺ de camundongos INF foi reduzida no 15º dpi (Fig. 17 B, histograma preto), os níveis de marcação para a sialomucina CD43 em células T CD8⁺ de camundongos ITSa foi restaurado (Fig. 17 B, histograma cinza), apresentando níveis de marcação semelhantes às células T CD8⁺ de camundongos não infectados (Fig. 17 B, histogramas pontilhados).

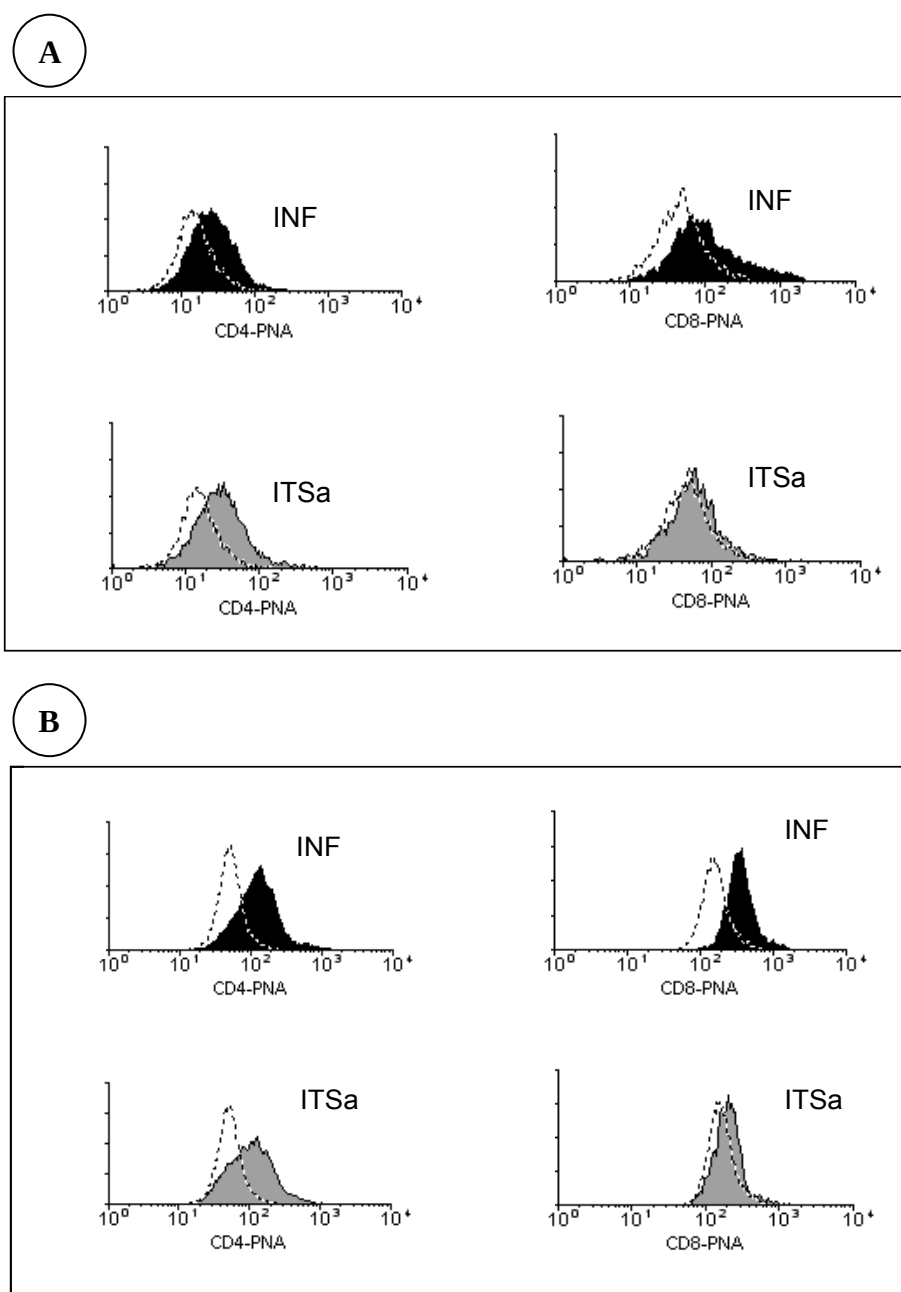


Figura 16. Glicomoléculas em linfócitos T CD8⁺ ativados de camundongos ITSa apresentam um glicofenótipo PNA^{low}. Camundongos Balb/c foram infectados (histogramas pretos e cinzas) ou não (histogramas pontilhados) e tratados com TSa (histogramas cinzas) ou PBS (histogramas pretos). No 8º (A) e 15º (B) dpi, os camundongos foram sacrificados, os baços macerados e os leucócitos esplênicos totais obtidos após a lise das hemácias por choque hipotônico. O glicofenótipo das células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi acessado por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais fluorescentes direcionados contra ambas as populações de células T (CD4⁺/CD8⁺) em associação com a lectina PNA-FITC, como discriminante de glicomoléculas de-sialiladas. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares e fenotípicas desejadas. Histogramas pontilhados (N); Histogramas pretos (INF); Histogramas cinzas (ITSa).

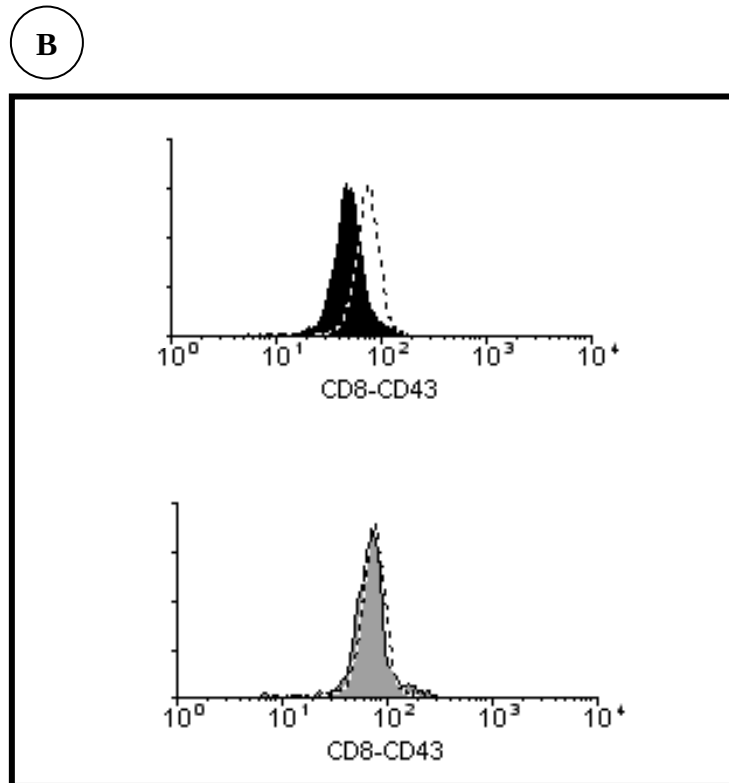
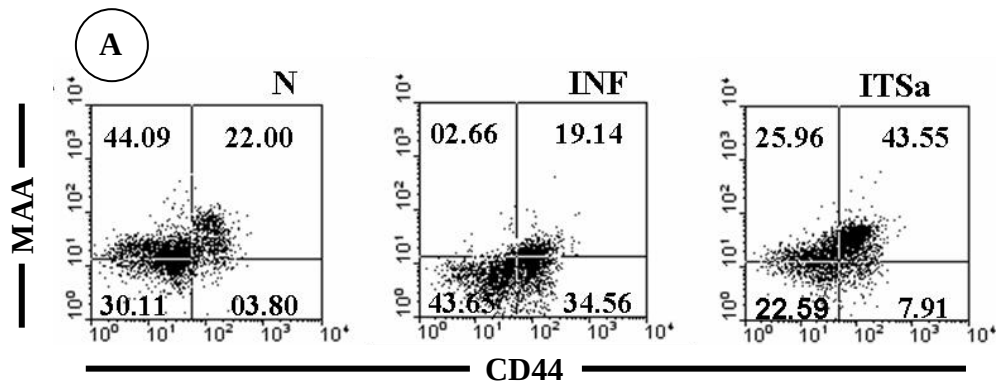


Figura 17. A TSa re-sialila células T CD8⁺ ativadas durante a infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos Balb/c foram infectados (INF) ou não (N) e tratados (ITSa) ou não com TSa. No 15^o dpi, os animais foram sacrificados e as células T CD8⁺ foram purificadas por seleção negativa como descrito nos materiais e métodos. (A) As células T CD8⁺ purificadas foram marcadas com a lectina fluorescente MAA II, que reage com o α 2-3 AS, com o marcador de ativação fluorescente CD44, (B) e com um anticorpo direcionado contra a sialomucina CD43 (α CD43-FITC, clone S7), que reage especificamente com a glicofoma de baixo peso (115 kDa), sialilada com o α 2-3 AS. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares e fenotípicas desejadas. (B) Histogramas pontilhados (N); Histogramas pretos (INF); Histogramas cinzas (ITSa).

4.8. A TS nativa do *T. cruzi* re-sialila glicomoléculas de superfície celular em células T CD8⁺ ativadas durante a infecção chagásica experimental

Estudos recentes têm demonstrado que após a injeção da enzima recombinante por via endovenosa em diferentes concentrações (0,5; 1,0; 5,0 e 10 µg) foi possível detectar a atividade *trans*-sialidásica no soro dos camundongos até 72 - 96 horas após o tratamento (Tribulatti *et al.*, 2005). Visando avaliar se os efeitos descritos anteriormente (Fig. 16 e 17) estariam sendo mediados pela TSa recombinante, a atividade *trans*-sialidásica foi verificada pela quantificação da transferência do AS para o acceptor (C¹⁴-lactosamina) por cintilação líquida, utilizando camundongos N, NTSa, INF e ITSa. Como poder ser observado na figura 18, no 4º dia após o primeiro tratamento (NTSa-4), foi possível observar uma redução marcante (63,88 %) da atividade *trans*-sialidásica no soro dos camundongos tratados quando comparado ao grupo NTSa-2 (2º dia após o primeiro tratamento). No 8º dia após o primeiro tratamento, não foi possível detectar atividade enzimática no soro dos camundongos normais tratados (NTSa-8). De maneira surpreendente, no pico da parasitemia foi possível observar um aumento significativo da atividade *trans*-sialidásica no soro de camundongos ITSa (ITSa-8), quando comparado ao grupo INF (INF-8), sugerindo que os efeitos biológicos descritos anteriormente (re-sialilação de células T CD8⁺) poderiam estar sendo mediados pela TS nativa do parasito, em decorrência do aumento da parasitemia.

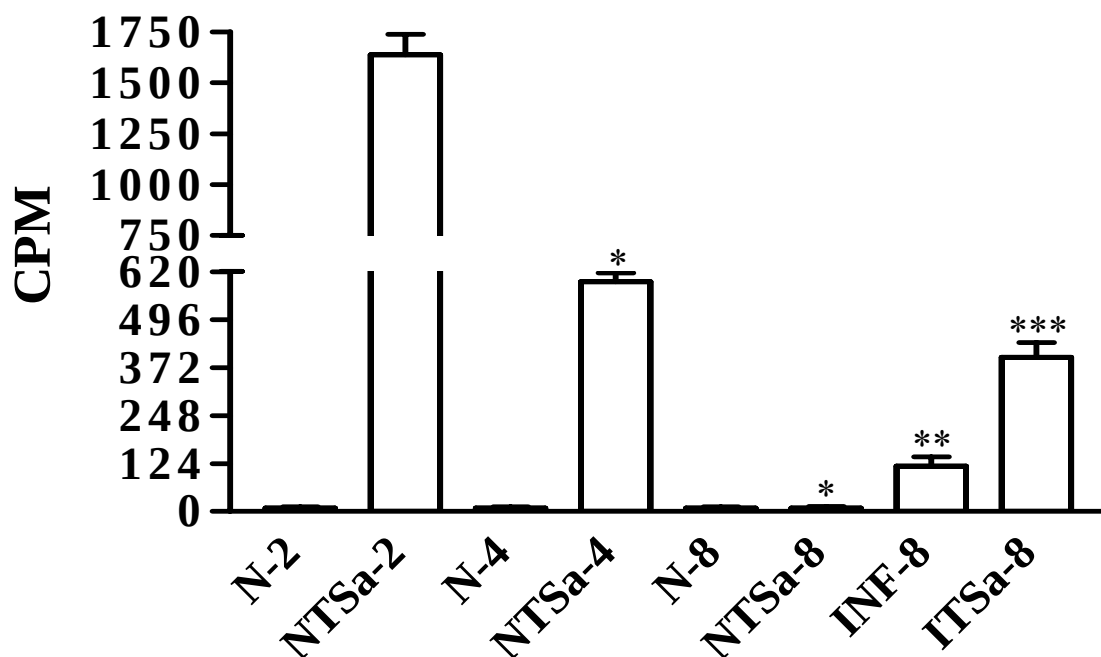


Figura 18. Quantificação da atividade *trans*-sialidásica no soro de camundongos normais e infectados com o *T. cruzi*. Camundongos Balb/c foram (INF e ITSa) ou não (N-2, NTSa-2, N-4, NTSa-4, N-8 e NTSa-8) infectados e tratados (NTSa-2, NTSa-4, NTSa-8 e ITSa-8) ou não (N-2, N-4, N-8 e INF) com TSa como descrito nos materiais e métodos. No 2º (N e NTSa-2), 4º (N e NTSa-4) e 8º (N e NTSa-8, INF-8 e ITSa-8) dia após o primeiro tratamento, a atividade *trans*-sialidásica no soro dos camundongos foi determinada pela formação de sialil-[^{14}C -lactosamina] a partir da reação contendo 10 μL do soro de cada camundongo pré-incubado por 60 minutos com o substrato doador sialillactose (1 mM) e o acceptor ^{14}C -lactosamina (0,4 nM) em 10 μL de Tris/HCl 20 mM pH 7,2. Após incubação à temperatura ambiente, a reação foi finalizada pela adição de 1 mL de água destilada. O produto radioativo sialilado foi purificado por cromatografia em coluna de 1 mL de DOWEX 1X8, equilibrada com água destilada. O acceptor não sialilado (^{14}C -lactosamina) foi eluído com 20 mL de água, e o produto da reação (sialil-[^{14}C -lactosamina]) ligada à coluna foi eluída com 3 mL de acetato de amônio 0,8 M e quantificada por cintilação líquida. (*, valores significativos em relação ao grupo NTSa-2, $p < 0.001$); (**, valores significativos em relação ao grupo N-8, $p < 0.05$); (***, valores significativos em relação ao grupo INF, $p < 0.05$).

4.9. A re-sialilação de células T CD8⁺ compromete a atividade citotóxica *in vitro*

Os AS são caracterizados por apresentarem carga negativa (Varki & Varki, 2007), e alguns trabalhos tem especulado que sua presença na superfície celular dificulte a interação célula-célula devido à repulsão por carga (Suzuki *et al.*, 2004). Seria possível portanto especular, que a re-sialilação de células T CD8⁺, como resultado do aumento da atividade *trans*-sialidásica no soro de camundongos ITSa poderia comprometer a atividade citotóxica mediada por células T CD8⁺ antígeno específicas. Para confirmar essa hipótese, células T CD8⁺ de camundongos INF foram bioquimicamente re-sialiladas (INFR) *in vitro* usando fetuína como molécula doadora de AS e TSa como fonte enzimática (Fig. 19 A). Células T CD8⁺ de camundongos não infectados (N) foram utilizadas como controle negativo. O efeito citotóxico *in vitro* foi determinado por citometria de fluxo, como descrito no item 3.12 dos materiais e métodos pelo desaparecimento da população alvo incubada com o peptídeo sintético IYNVGQVSI. Como pode ser observado na figura 19 B, no grupo INF foi possível observar um aumento gradativo da lise das células alvo em todas as proporções (células alvo: células efectoras) utilizadas. Contudo, na presença de células T CD8⁺ re-sialiladas, a lise das células alvo foi significativamente reduzida, demonstrando que a re-sialilação de células T CD8⁺ antígeno específicas compromete sua atividade citotóxica. A figura 19 C ilustra o percentual de lise das células alvo na proporção 1: 30 (células alvo: células efectoras) nos diferentes grupos experimentais.

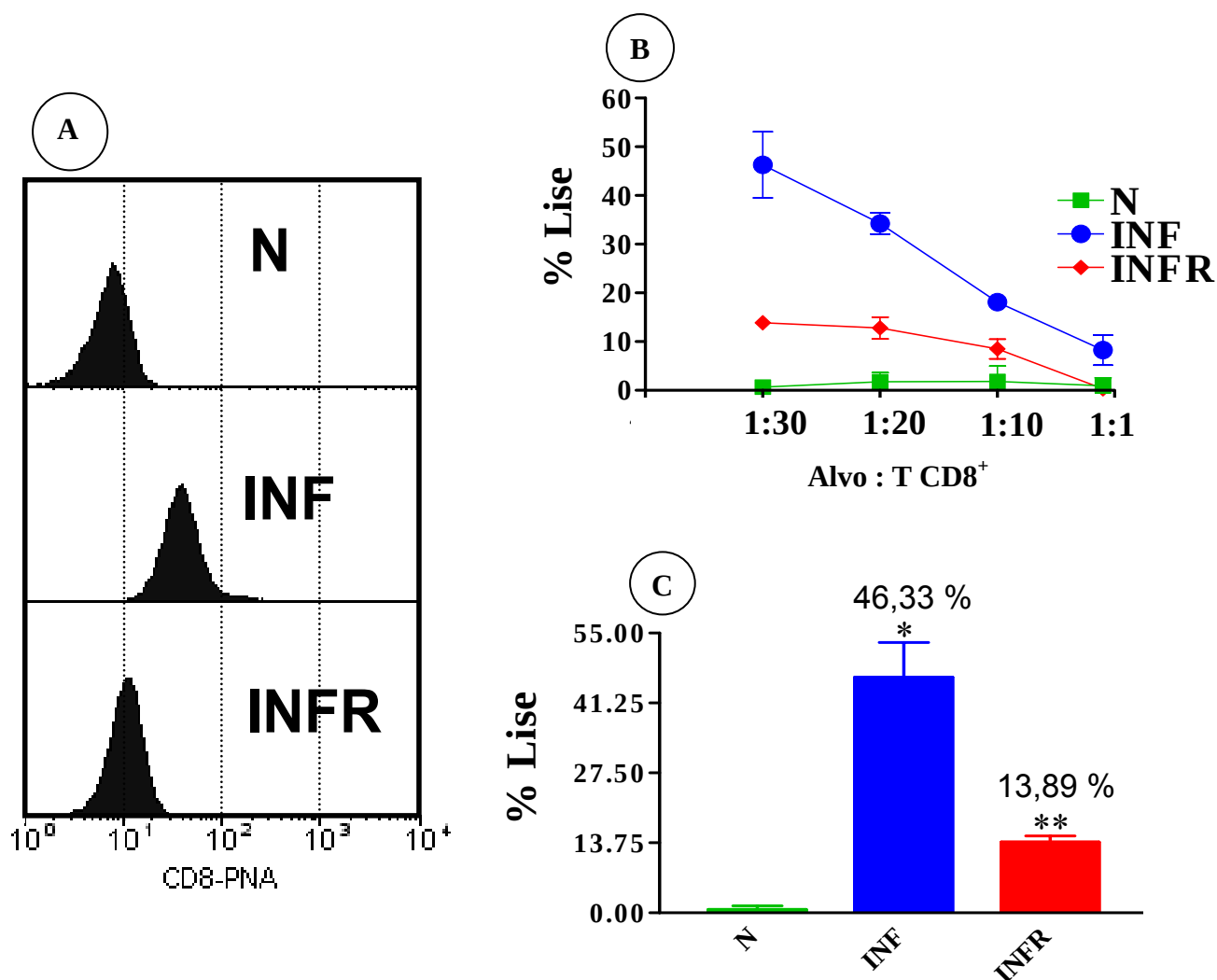


Figura 19. Células T CD8⁺ antígeno específicas re-sialiladas *in vitro* apresentam atividade citotóxica reduzida. Camundongos Balb/c foram infectados com *T. cruzi* (INF), e no 15º dpi, as células T CD8⁺ esplênicas foram purificadas por seleção negativa e utilizadas como células efetoras. (A) Parte das células T CD8⁺ dos animais infectados foram re-sialiladas (INFR) ou não (INF) usando fetuína como molécula doadora de ácido siálico e Tsa como fonte enzimática. Células T CD8⁺ de camundongos não infectados (N) foram utilizadas como controle negativo. Células da linhagem A20J foram utilizadas como células estimuladoras e marcadas com 1,0 ou 10 μ M do corante vital CFSE. A população marcada com 10 μ M tornou-se população alvo após incubação com o peptídeo sintético IYNVGQVSI. Ambas as populações foram contadas e ajustadas antes de serem plaqueadas em diferentes proporções (células alvo: células efetoras, 1:1; 1:10, 1:20 e 1:30). A resposta antígeno específica foi monitorada por citometria de fluxo após 20 horas de incubação, pelo desaparecimento da população alvo (10 μ M CFSE + peptídeo sintético). (B) Percentual de lise das células alvo nas diferentes proporções (células efetoras: células alvo) utilizadas. (C) Percentual de lise obtido nos poços contendo 30 células efetoras para 1 célula alvo. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares desejadas (*, valores significativos em relação ao grupo N, $p < 0.001$); (**, valores significativos em relação aos grupos N e INF, $p < 0.05$).

4.10. A TS nativa do *T. cruzi* re-sialila células T CD8⁺ *in vivo* e compromete sua atividade citotóxica

Sustentado pelo último experimento, onde foi observado que a atividade citotóxica de células T CD8⁺ foi comprometida após a re-sialilação *in vitro*, associado com os resultados apresentados na figura 15, onde células T CD8⁺ de camundongos ITSa apresentaram um glicofenótipo PNA^{low} no 15º dpi, um possível comprometimento da atividade lítica de células T CD8⁺ *in vivo* foi avaliado utilizando o mesmo peptídeo sintético descrito acima em associação com o protocolo de citotoxicidade *in vivo* descrito no item 3.13 dos materiais e métodos. A figura 19 A ilustra a lise das células alvo nos diferentes grupos experimentais pelo desaparecimento da população marcada com 10 µM de CFSE e pulsada com o peptídeo sintético. Enquanto no grupo não infectado (N) foi possível observar as duas populações celulares (1,0 e 10 µM), nos grupos INF e ITSi a população alvo (10 µM) desapareceu devido a lise mediada por células T CD8⁺ antígeno específicas (Fig. 20 A). Entretanto, a resposta antígeno específica mediada por células T CD8⁺ de camundongos ITSa foi aparentemente reduzida (Fig. 20 A). Esse fenômeno pode ser observado com mais clareza na figura 20 B, onde nos grupos INF e ITSi foi possível detectar mais de 90 % de lise da população alvo. Todavia, no grupo ITSa, a lise caiu para 68 % (Fig. 20 B). Com o objetivo de verificar as características glicofenotípicas de células T CD8⁺ nos grupos estudados, os esplenócitos de cada grupo experimental foram marcados com αCD8 e PNA e analisados por citometria de fluxo. Como pode ser observado na figura 20 C, enquanto parte (46,5 %) das células T CD8⁺ do grupo INF apresentaram-se positivas para PNA (PNA^{high}), as células T CD8⁺ do grupo ITSa apresentaram níveis de marcação para PNA (PNA^{low}) semelhantes as células T CD8⁺ de camundongos não infectados (N) (Fig. 20 C). De maneira surpreendente, a administração de TSi recombinante em animais

infectados proporcionou um aumento considerável da marcação para PNA em células T CD8⁺ (Fig. 20 C), sugerindo que a enzima inativa por apresentar propriedades lectínicas possa estar se associando a unidades terminais de α 2-3 AS e competindo com a TS nativa do parasito, comprometendo um fenômeno natural de re-sialilação que ocorre durante a infecção pelo *T. cruzi*.

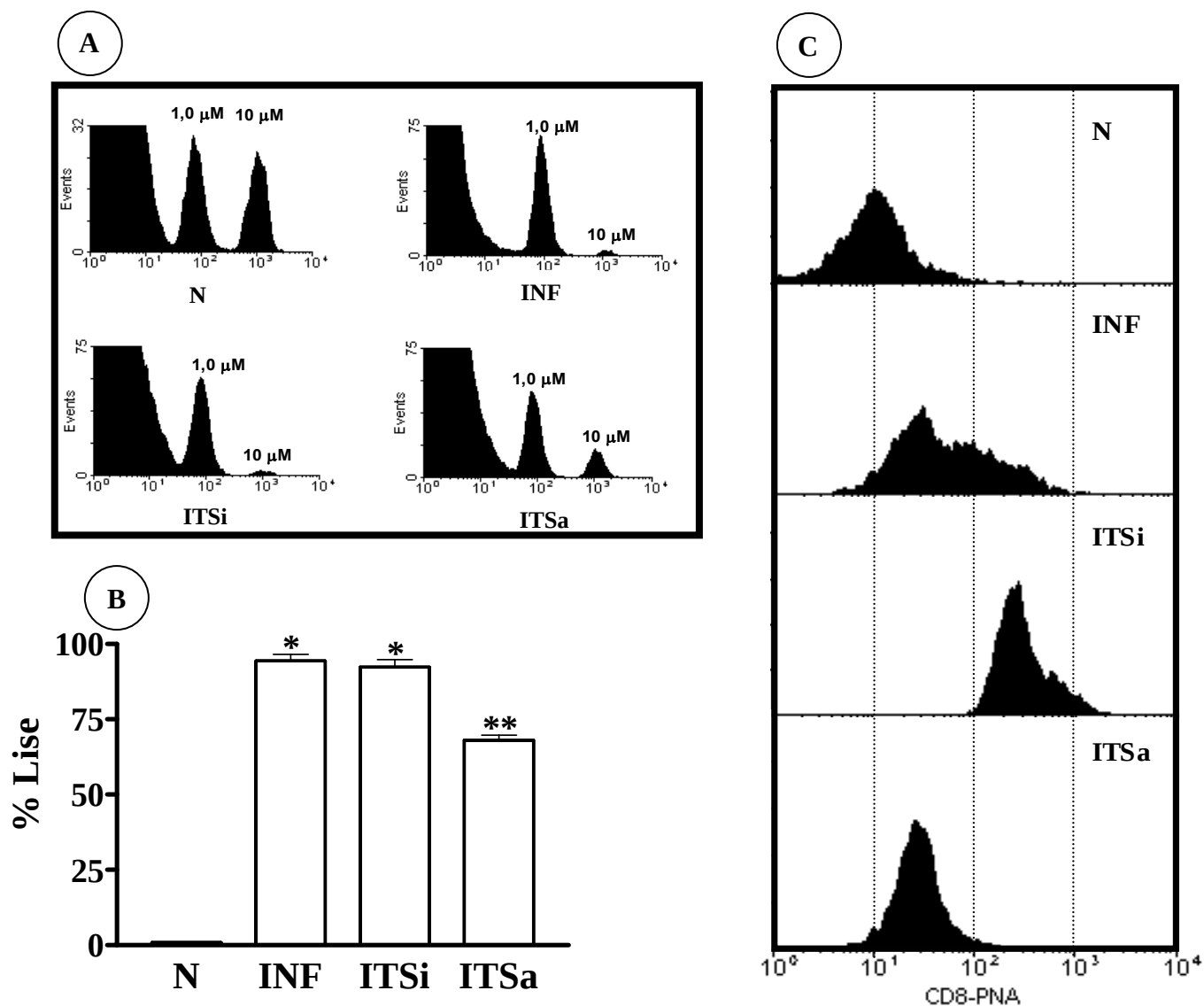


Figura 20. Células T CD8⁺ de camundongos ITSa apresentam atividade citotóxica reduzida. Camundongos Balb/c foram ou não (N) infectados com *T. cruzi*, e tratados com PBS (INF), ou com TSi (ITSi), ou TSa (ITSa). No 14º dpi, células esplênicas de animais singênicos foram marcadas com 1,0 ou 10 μM de CFSE. A população marcada com 10 μM tornou-se população alvo após incubação com o peptídeo sintético IYNVGQVSI. Ambas as populações foram contadas e ajustadas antes do inóculo por via endovenosa contendo $2,0 \times 10^7$ células ($1,0 \times 10^7 - 1,0 \mu\text{M}$ / $1,0 \times 10^7 - 10 \mu\text{M}$) em camundongos recipientes normais (N), infectados (INF), infectados e tratados com TSi (ITSi) e infectados e tratados com TSa (ITSa). (A) Resposta antígeno específica monitorada por citometria de fluxo pelo desaparecimento da população alvo (10 μM CFSE + peptídeo sintético). (B) Percentual de lise obtido em cada grupo experimental (*, valores significativos em relação ao grupo N, $p < 0.001$); (**, valores significativos em relação aos grupos N e INF, $p < 0.05$). (C) Análise glicofenotípica das células T CD8⁺ dos grupos experimentais estudados usando a lectina PNA como discriminante de glicomoléculas de-sialiladas. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dieckson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas, definidas através das marcações celulares desejadas.

5. Discussão

Em células de mamíferos, os glicoconjugados de superfície celular controlam uma variedade de eventos biológicos, incluindo diferenciação celular, tráfego de células inflamatórias para tecidos específicos, adesão celular, interação parasito/célula hospedeira e respostas imunológicas (Mahal, 2008). Na última década, um novo ramo da ciência denominado imunoglicobiologia tem chamado à atenção dos glicobiologistas e imunologistas, que tentam entender a funcionalidade destas glicomoléculas, baseado nas suas características estruturais, bem como nas suas propriedades imunobiológicas. Por sua expressão diferencial (Fig. 21) em diferentes estágios de desenvolvimento das células T, a importância do AS em eventos críticos, incluindo a maturação de timócitos (Moody *et al.*, 2001; Moody *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2008), reconhecimento antigênico (Akha *et al.*, 2006; Brennan *et al.*, 2006), ativação (Pappu & Shrikant, 2001; Hernandez *et al.*, 2007) e sobrevivência (Peter *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 2003; Mucci *et al.*, 2006; Van Dyken *et al.*, 2007) e infecção (Galvan *et al.*, 1998) têm sido estudada. No entanto, não existem estudos sobre o impacto da sialilação em células T na resposta a infecção pelo *T. cruzi*, que libera grandes quantidades de *trans*-sialidase no soro de indivíduos infectados (revisto por Colli, 1993).

O objetivo do presente estudo foi determinar possíveis mecanismos moleculares que contribuem para que a TSa do parasito atue como um fator de virulência durante a infecção chagásica experimental. Nossos resultados iniciais corroboraram dados já descritos na literatura (Chuenkova & Pereira, 1995; Leguizamon *et al.*, 1999; Mucci *et al.*, 2002, 2005, 2006; Risso *et al.*, 2006), sendo demonstrado por diferentes experimentos (parasitemia, índice de sobrevivência, histopatologia e real time-PCR) que somente a TSa atua como um fator de virulência durante a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que o perfil da infecção em camundongos ITSi foi semelhante ao dos camundongos

INF. Esses dados comprovam que a virulência induzida por proteínas pertencentes à família TS é mediada pela atividade catalítica da TS e não pelo SAPA localizado na porção C-terminal como foi sugerido por Saavedra e colaboradores (1999), uma vez que camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com a TSi apresentaram o mesmo perfil de infecção dos camundongos controle. A TSi atua como uma lectina apresentando sítios de ligação para AS α 2-3- e β Galp, podendo mediar a interação do parasito com células hospedeiras (Dias *et al.*, 2008). Neste trabalho demonstramos que quando a TSi foi co-injetada com a TSa, os efeitos biológicos (aumento da carga parasitária e secreção de citocinas por células T esplênicas) induzidos pela forma ativa foram inibidos. Como a TSi interage com seus ligantes com a mesma especificidade que seu análogo ativo (Cremona *et al.*, 1999; Todeschini *et al.*, 2002, 2004), podemos sugerir que a TSi possa competir *in vivo* com a TSa por unidades de AS α 2-3- e β -Galp presentes em glicoproteínas séricas ou de superfície celular, comprometendo os efeitos biológicos desencadeados pela atividade enzimática.

Os resultados obtidos durante as análises imunohistoquímicas e por citometria de fluxo revelaram que a administração da TSi reduziu, de forma marcante, o número de ambas as populações de células T infiltrantes no coração quando comparado aos camundongos do grupo INF. Baseado nas propriedades lectínicas da forma inativa (Cremona *et al.*, 1999; Todeschini *et al.*, 2002, 2004) podemos sugerir que a TSi possa se associar a epítomos sialilados, presentes por exemplo, na sialomucina CD43, que além de desempenhar um papel importante no tráfego de células T para tecidos alvo (Baum *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; McEvoy *et al.*, 1997; Ostberg *et al.*, 1998; Onami *et al.*, 2002; Ford *et al.*, 2003; Stockton *et al.*, 1998; Fuhlbrigge *et al.*, 2005) foi proposto ser um possível ligante da TSi em células T (Todeschini *et al.*, 2002). Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a TSi quando injetada por

via endovenosa, foi capaz de comprometer o tráfego de neutrófilos para sítios alvos durante estágios iniciais da inflamação. Além disso, foi demonstrado, que tal fenômeno foi mediado pela interação da TSi com a sialomucina CD43 na superfície dos neutrófilos (Faragasso *et al.*, dados não publicados). Desta maneira, tais interações podem mascarar epítomos sialilados biologicamente importantes no processo de transmigração leucocitária.

O genoma do parasito apresenta o mesmo número de cópias para TSi e TSa (Cremona *et al.*, 1999). Contudo, nenhum trabalho confirmou se durante diferentes estágios da infecção, as duas enzimas são expressas em níveis semelhantes ou há uma expressão diferencial da TSi ou TSa. Certamente, tais estudos contribuiriam para o melhor entendimento do papel das proteínas da família TS durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

Investigando os efeitos pró-apoptóticos das proteínas pertencentes à família TS, obtivemos resultados que estão de acordo com os dados já descritos na literatura, uma vez que a TSa, mas não a TSi, foi capaz de induzir a apoptose de células T esplênicas quando injetada em camundongos não infectados. Neste trabalho, mostramos que a administração da TSa em camundongos normais induziu a morte de células T CD4⁺ e T CD8⁺ por um mecanismo dependente da via FAS, já que camundongos deficientes para FASL (*gld*) mostraram-se resistentes ao tratamento. Resultados publicados a partir do final da década de 90 têm demonstrado que a administração da TSa em camundongos não infectados induz a morte de timócitos e células T maduras por apoptose (Leguizamón *et al.*, 1999; Mucci *et al.*, 2002, 2005, 2006). Recentemente foi proposto um possível mecanismo responsável por este fenômeno, a re-sialilação de glicomoléculas de superfície em timócitos e células T maduras pela TSa (Mucci *et al.*, 2006). Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos pró-apoptóticos da

TSa ainda não serem conhecidos, os nossos resultados e os descritos na literatura nos permitem elaborar as seguintes hipóteses:

(a) Pelo fato do AS apresentar uma elevada carga negativa, muitos trabalhos têm demonstrado sua importância no controle das interações intermoleculares. Suzuki e colaboradores (2003) demonstraram que a remoção de unidades de AS presentes em glicoconjugados de superfície celular favoreceu as interações intermoleculares (FAS/FASL), contribuindo para a apoptose de células T Jurkat. Como demonstrado na figura 14 B, a injeção da TSa em camundongos não infectados promoveu a de-sialilação de glicoproteínas de superfície em células T não ativadas, uma vez que tais células passaram a apresentar um glicofenótipo PNA^{high}. Desta maneira, nossos resultados sugerem, que em glicomoléculas de células T *naive* (PNA^{low}), a TSa desempenhe propriedades sialidásicas a partir da remoção de unidades de AS α 2-3, facilitando as interações intermoleculares e contribuindo para a apoptose de ambas populações de células T.

(b) Outras moléculas conhecidas como galectinas também vêm sendo estudadas por seus efeitos pró-apoptóticos. As galectinas constituem uma família conservada de proteínas definida pela presença de um CRD com especificidade para β -galactosídeos (Barondes *et al.*, 1994). Hoje, 15 tipos de galectinas em mamíferos já são conhecidos (Rabinovich *et al.*, 2007), no entanto a galectina-1, que foi a primeira a ser descoberta em células de mamíferos, é a mais estudada (Cooper, 2002). A galectina-1 está envolvida em inúmeros processos biológicos como a adesão celular (Baum *et al.*, 1995), migração (Camby *et al.*, 2002) e na indução da apoptose em timócitos e células T maduras (Baum *et al.*, 1995, 1996, 2002; Perillo *et al.*, 1995, 1997). Na tentativa de entender os mecanismos pró-apoptóticos induzidos pela galectina-1, alguns grupos definiram possíveis moléculas em células T que funcionem como seus ligantes. Foi

demonstrado que o dissacarídeo Gal β 1-4GlcNAc é capaz de se associar à galectina-1, contudo, esta lectina apresentou maior especificidade para cadeias oligossacarídicas contendo seqüências lineares de polilactosamina (Zhou & Cummings, 1993). Como lactosaminas estão presentes em glicanas *N* e *O*-ligadas, possíveis contra-receptores presentes em glicoproteínas expressas em células T são potenciais ligantes para galectina-1, tais como, CD2, CD3, CD4, CD7, CD43 e CD45 (Pace *et al.*, 1999; Walzel *et al.*, 2000, 1999). Em *O*-glicanas, a adição de seqüências de polilactosamina é controlada basicamente pela atividade da enzima β 1-6-*N*-acetilglucosaminiltransferase (2 Gnt), que transfere unidades de GlcNAc para unidades terminais de GalNAc no core-1, criando o core-2 (Srivastava & Hindsgaul, 1992). Subseqüentemente, unidades repetitivas de Gal e GlcNAc podem ser adicionadas a este core (Maemura & Fukuda, 1992). Em glicanas *N*-ligadas, a enzima β -1,6-*N*-acetilglucosaminiltransferase (Gnt V) regula a formação de cadeias lineares de polilactosamina a partir da transferência de GlcNAc para a unidade terminal de manose do core trimanosil em cadeias *N*-ligadas (Shoreibah *et al.*, 1993), criando condições para a adição de unidades repetitivas de Gal e GlcNAc nas estruturas GlcNAc β 1-2Man ou GlcNAc β 1-6-Man (Ujita *et al.*, 1999). Na tentativa de avaliar o número de seqüências de lactosamina (Gal-GlcNAc) em glicanas *N* ou *O*-ligadas que poderiam regular a susceptibilidade celular a morte induzida por galectina-1, Galvan e colaboradores (2000) demonstraram que a linhagem celular que expressa a enzima 2 Gnt é altamente suscetível ao tratamento com galectina-1, quando comparada à linhagem que não expressa esta glicosiltransferase. Estes resultados comprovaram que a apoptose de células T induzida por galectina-1 ocorre preferencialmente a partir de um ligante expresso em cadeias *O*-ligadas, gerado pela ação da enzima 2 Gnt e não pela Gnt V em cadeias *N*-ligadas. Como ilustrado na figura 21, após a seleção negativa na medula tímica, as glicoproteínas de superfície em células

T maduras encontradas em órgãos linfóides secundários, tal como o baço, passam a apresentar um glicofenótipo PNA^{low}, em consequência do aumento da atividade ST (Moody *et al.*, 2003). Baseado nestes dados, seria possível imaginar que a TSa poderia de-sialilar cadeias lineares de polilactosamina em glicomoléculas de superfície dos linfócitos não ativados, gerando sítios de ligação para proteínas pertencentes à família das galectinas, em especial a galectina-1, que tem seu efeito pró-apoptótico bem estabelecido em células T. Em 2004, foi demonstrado que os mecanismos moleculares que regulam a morte celular induzida por galectina-1 são distintos daqueles envolvidos na via clássica (FAS/FASL), não havendo ativação de caspases e alteração do potencial de membrana mitocondrial (Hahn *et al.*, 2004). Entretanto, Matarrese e colaboradores (2005) demonstraram que a morte de células T induzida por galectina-1 foi dependente da interação desta lectina com o receptor FAS, promovendo alteração do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspase-8. Apesar de tais conflitos, é possível propor, com base no que é descrito na literatura, que a galectina-1 não participa na morte de células T induzida pela TSa, uma vez que nossos resultados demonstraram que o ligante do receptor de morte FAS (FASL) é determinante na indução da apoptose. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que outras moléculas pertencentes a esta família estejam envolvidas neste processo.

(c) Estudos recentes têm documentado as propriedades pró-apoptóticas dos “siglecs”, que são capazes de funcionar como receptores de superfície celular reconhecendo epítomos sialilados (Crocker, 2005). Foi demonstrado que a incubação de neutrófilos com anti-siglec 8 (Nutku *et al.*, 2005) foi capaz de ativar a via das caspases, além de induzir a perda do potencial de membrana mitocondrial das células. Apesar de nenhuma evidência experimental descrever as propriedades pró-apoptóticas desta classe de moléculas em linfócitos, não se pode descartar a hipótese de que tal processo exista,

uma vez que outros membros desta família, tais como o siglec-7 (Ikehara *et al.*, 2004) e o siglec-3 (Hernandez-Caselles *et al.*, 2006) são expressos em células T. Além disso, o siglec-9, que apresenta propriedades pró-apoptóticas em neutrófilos (Von Guntem *et al.*, 2005) também está presente em ambas às populações de linfócitos T. No entanto, nós observamos durante nossos experimentos, que células T de camundongos não infectados e tratados com a TSa foram de-sialiladas e passaram a apresentar o glicofenótipo PNA^{high} (Fig. 14 B). Desta maneira, seria difícil imaginar que algum siglec poderia estar participando dos eventos pró-apoptóticos induzidos pela TSa, uma vez que moléculas pertencentes a esta família dependem de epítopos sialilados para sua interação.

Resultados publicados a partir do final da década de 90 (Nunes *et al.*, 1998; Freire-de-Lima *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2003) podem ser utilizados para explicar como a apoptose de células T esplênicas induzida pela TSa aumenta a parasitemia em camundongos infectados. Nunes *et al.* (1998) demonstraram que o co-cultivo de macrófagos infectados com células T CD4⁺ apoptóticas foi capaz de exacerbar a replicação do *T. cruzi in vitro*. Os mecanismos moleculares responsáveis por este fenômeno foram descritos posteriormente por Freire-de-Lima e colaboradores (2000), sendo evidenciado que a interação de macrófagos infectados com células T apoptóticas promoveu a secreção de TGF- β , prostaglandina E₂ e poliaminas pelos macrófagos, contribuindo para o aumento da carga parasitária. Estes resultados sugerem que a apoptose induzida pela TSa e a fagocitose de células T apoptóticas por macrófagos têm um papel crítico na persistência do *T. cruzi* no hospedeiro infectado.

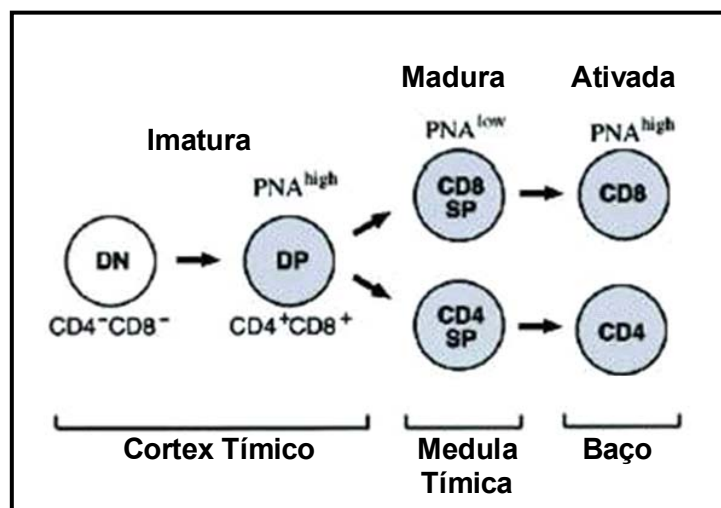


Figura 21. Esquema representativo dos estágios de maturação de ambas as populações de células T, definidas por mudanças na expressão dos co-receptores CD4⁺ e CD8⁺ e pela sensibilidade a marcação com PNA. Adaptado de Moody e colaboradores (2003). DN - Duplo negativos; DP - Duplo positivos; SP - Simples positivos.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram, que células T CD8⁺ ativadas de camundongos ITSa, ao contrário dos animais INF, passaram a apresentar um glicofenótipo PNA^{low}, sugerindo que a *trans*-sialidase do parasita no soro de indivíduos infectados possa estar re-sialilando asialoglicoconjugados de superfície em células T CD8⁺ ativadas. Este fenômeno foi mais evidente em células T CD8⁺ quando comparado às células T CD4⁺. Isso pode ser explicado pela maior expressão de glicoconjugados altamente *O*-glicosilados na superfície das células T CD8⁺ quando comparado às células T CD4⁺ (Pace *et al.*, 1999; Walzel *et al.*, 2000). Além disso, foi observado, que as células T CD8⁺ de camundongos ITSa re-sialiladas apresentaram níveis de expressão para CD44 semelhante aos detectados em células T CD8⁺ de camundongos INF, um indicativo de que tais células apesar de re-sialiladas permaneceram apresentando fenótipo de células T ativadas. Também foi demonstrado, que a sialomucina CD43 na superfície de tais células (T CD8⁺) atua como um acceptor de AS durante a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que os níveis de marcação para o anticorpo α CD43 (S7), que reage com a glicoforina de 115 kDa sialilada com o AS α 2-3- foi

restaurado, apresentando níveis de marcação semelhante aos detectados em células T CD8⁺ de camundongos N.

Muitos trabalhos têm demonstrado a importância da sialilação de células T CD8⁺ em diferentes etapas de seu desenvolvimento. Entre tais trabalhos, podem-se destacar os resultados *in vitro* publicados por Pappu e Shrikant (2004) e Akha e colaboradores (2006), onde foi demonstrado respectivamente, que a manipulação do estado de sialilação de células T CD8⁺ promoveu alterações na cinética de ativação, bem como na resposta citotóxica destas células. Entretanto, até o momento nenhuma descrição do impacto da sialilação de células T CD8⁺ em resposta para microrganismos infecciosos, especificamente o *T. cruzi* foi documentada. No presente trabalho foi demonstrado, utilizando o peptídeo sintético IYNVGQVSI, que a re-sialilação de células T CD8⁺ antígeno específicas *in vitro* e *in vivo* reduziu significativamente a resposta citotóxica mediada por estas células. Além disso, foi observado, que a administração da TSi em camundongos infectados aumentou os níveis de marcação para PNA. Tal fenômeno pode ser explicado pelo fato da TSi ter a capacidade de se associar a epítopos sialilados presentes em glicoproteínas séricas e comprometer um fenômeno natural de re-sialilação que ocorre durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório reforçam a hipótese de que unidades de AS presentes em glicomoléculas de superfície atuem como uma barreira física no contato célula T CD8⁺ /célula alvo durante a infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que a lise de células alvo mediada por células T CD8⁺ de camundongos deficientes para a molécula CD43, que sabidamente atua como uma barreira física no contato T CD8⁺ /célula alvo em outros modelos de infecção (Manjunath *et al.*, 1995), foi maior quando comparado à lise mediada por células T CD8⁺ de animais selvagens (Alisson-Silva *et al.*, dados não publicados).

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir, que a TSi e a TSa apresentam distintos efeitos durante a infecção chagásica experimental, e que as propriedades pro-apoptóticas induzidas pela TSa em células T não ativadas (PNA^{low}) ocorre a partir da de-sialilação de glicomoléculas de superfície dos linfócitos favorecendo interações intermoleculares, como por exemplo, a interação do receptor de morte FAS com seu ligante natural FASL. Além disso, nos demonstramos pela primeira vez, que a re-sialilação de células T CD8⁺ ativadas (PNA^{high}) pela TS do *T. cruzi* compromete importantes interações intermoleculares, como por exemplo, TCR/MHC I. Sendo assim, tal fenômeno (re-sialilação) pode ser considerado um novo e importante mecanismo de evasão do *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção, impedindo a lise de células alvo e proporcionando o escape e perpetuação do parasito no hospedeiro infectado.

6. Referências

- Acosta-serrano, A., Almeida, I.C., Freitas-Junior, L.H., Yoshida, N., Schenkman (2001). The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. *Mol. Biochem. Parasitol.* **114**: 143-150
- Agrellos, O.A., Jones, C., Todeschini, A.R., Previato, J.O., Mendonca-Previato, L (2003). A novel sialylated and galactofuranose-containing *O*-linked glycan, Neu5Ac α 2-3Galp β 1-6(Galp β 1-4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. *Mol Biochem Parasitol* **126**: 93-96
- Alegre, M.L; Frauwirth, K.A & Thompson, C.B (2001). *Nat. Rev. Immunol.* **1**: 220-228
- Amado, M; Yan, Q; Comelli, E.M; Collins, B.E & Paulson J.C (2004). Peanut agglutinin high phenotype of activated CD8⁺ T cells results from de novo synthesis of CD45 glycans. *J. Biol. Chem.* **27**: 36689-36697
- Amano, M; Galvan, M; He, J & Baum, L.G (2003). The ST6Gal I Sialyltransferase Selectively Modifies *N*-Glycans on CD45 to Negatively Regulate Galectin-1-induced CD45 Clustering, Phosphatase Modulation, and T Cell Death. *J. Biol. Chem.* **278**: 7469-7475
- Andrews, N.W. (1994). From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 471-475
- Andrews NW. (2002). Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J Cell Biol.* **3**: 389-394
- Andrews, N.W; Hong, K.S; Robbins, E.S & Nussenzweig, V (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* **64**: 474-84

- Andrade Z.A (1991). Pathogenesis of Chagas' disease. *Res Immunol.* **142**: 126-129
- Barondes, S.H; Cooper, D.N; Gitt, M.A & Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**: 20807-20810
- Baum, L. G, Derbin, K., Perillo, N. L., Pang, M., Wu, T & Uittenbogaart, C (1996). Characterization of Terminal Sialic Acid Linkages on Human Thymocytes. *J. Biol. Chem.* **18**: 10793-10799
- Baum, L.G (2002). Developing a taste for sweets. *Immunity.* **16**: 5-8
- Baum, L.G; Pang, M; Perillo, N.L; Wu, T; Delegeane, A; Uittenbogaart, C.H; Fukuda, M & Seilhamer, J.J. (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* **181**: 877-887
- Bax, M; García-Vallejo, J.J; Jang-Lee, J; North, S.J; Gilmartin, T.J; Hernández, G; Crocker, P.R; Leffler, H; Head, S.R; Haslam, S.M; Dell, A & van Kooyk, Y (2007). Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins. *J. Immunol.* **15**: 8216-8224
- Behar, S.M; Woodworth, J. S & Wu, Y (2007). Next generation: tuberculosis vaccines that elicit protective CD8⁺ T cells. *Expert. Rev. Vaccines.* **6**: 441-456
- Bento, C.A; Melo, M.B; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L & Pecanha, L.M. (1996). Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. *J. Immunol.* **157**: 4996-5001]
- Berninsone, P.M (2006). Carbohydrates and glycosylation. *WormBook.* **18**: 1-22

- Bilate, A.M, Previato, J.O; Mendonca-Previato, L & Pecanha, L.M. (2000). Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* induce B cell hyper-responsiveness in vivo. *Glycoconj. J.* **17**: 727-734
- Brener, Z (1992) Immune response and immunopathology in *T. cruzi* infection. In *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E. & Rasse, A. eds. *ISBT, São Paulo*. 31-48
- Brener, Z (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* **27**: 347-382.
- Brennan, P.J; Saouaf, S.J; Van Dyken, S; Marth, J.D; Li, B; Bhandoola, A & Greene, M.I; (2006). Sialylation regulates peripheral tolerance in CD4+ T cells. *Int Immunol.* **18**: 627-635
- Brewer, C.F; Miceli, M.C & Baum & L.G (2002). Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 616-623
- Brodskyn, C; Patricio, J; Oliveira, R; Lobo, L; Arnholdt, A; Mendonca-Previato, L; Barral, A & Barral-Netto, M. (2002). Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infect. Immun.* **70**: 3736-3743
- Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 175-200
- Buscaglia, C.A; Alfonso, J; Campetella, O & Frasch, A.C. (1998). Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. *Blood.* **93**: 2025-2032
- Buscaglia, C.A; Campetella, O; Leguizamon, M.S & Frasch, A.C. (1998). The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. *J. Infect. Dis.* **177**: 431-436

- Buscaglia, C.A; Campo, V.A; Frasch, A.C & Di Noia, J.M (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 229-236
- Buschiazzo, A; Frasch, A.C & Campetella, O (1996). Medium scale production and purification to homogeneity of a recombinant *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Mol. Biol.* **42**: 703-710
- Camargo, M.M; Almeida, I.C; Pereira, M.E; Ferguson, M.A; Travassos, L.R & Gazzinelli, R.T. (1997). Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* **158**: 5890-5901
- Camby, I; Belot, N; Lefranc, F; Sadeghi, N; de Launoit, Y; Kaltner, H; Musette, S; Darro, F; Danguy, A; Salmon, I; Gabius, H.J & Kiss, R. (2002). Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**: 585-596
- Campetella, O.E; Uttaro, A.D; Parodi, A.J; Frasch, A.C (1994) A recombinant *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase lacking the amino acid repeats retains the enzymatic activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **64**: 337-340
- Cardoso, A.V; Lescano, S.A; Amato-Neto, V; Gakiya, E & Santos, S.V (2006). Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **48**: 287-289
- Carreira, J.C., Jones, C., Wait, R., Previato, J.O., Mendonca-Previato L (1996). Structural variation in the glycoinositolphospholipids of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Glycoconj. J.* **13**: 955-966.
- Cazzulo, J.J & Frasch, A.C. (1992). SAPA/*trans*-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB. J.* **6**: 3259-3264

- Celli, S; Garcia, Z; Beuneu, H & Bousso, P (2008). Decoding the dynamics of T cell-dendritic cell interactions in vivo. *Immunol Rev.* **221**: 182-7
- Chagas, C. (1909). Nova Trypanosomiase humana. Estudos, morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen. n. sp. Agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.***1**: 159-218
- Chaves, L.B; Briones, M.R & Schenkman, S (1993) *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* **61**: 97-106
- Chervenak, R & Cohen, J.J (1982). Peanut lectin binding as a marker for activated T-lineage lymphocytes. *Thymus.* **4**: 61-67
- Chuenkova, M & Pereira, M.E (1995). *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *J. Exp. Med.* **1**: 1693-1703
- Clark, E.A & Ledbetter, J.A. (1994). How B and T cells talk to each other. *Nature.* **3**: 425-428
- Colli, W. (1993). *Trans*-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *FASEB. J.* **7**: 1257-1264
- Comelli, E.M; Sutton-Smith, M; Yan, Q; Amado, M; Panico, M; Gilmartin, T; Whisenant, T; Lanigan, C.M; Head, S.R; Goldberg, D; Morris, H.R; Dell, A & Paulson, J.C (2006). Activation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol.* **15**: 2431-2440
- Cooper, D.N. (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1572**: 209-231

- Coura, J.R (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **3**: 113-117
- Cremona, M.L; Campetella, O; Sánchez, D.O & Frasch, A.C (1999). Enzymically inactive members of the *trans*-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. *Glycobiology*. **9**: 581-587
- Cremona, M.L; Sanchez, D.O; Frasch, A.C.C & Campetella, O. (1995) A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi trans*-sialidases. *Gene*. **160**: 123-128
- Crocker, P.R (2005). Siglecs in innate immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**: 431-437
- Cummings, K.L & Tarleton, R.L (2003). Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* **129**: 53-59
- Davey, G.M; Schober, S.L; Endrizzi, B.T; Dutcher, A.K; Jameson, S.C & Hogquist, K.A (2003). Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells. *J. Exp. Med.* **16**: 1867-1874
- de Diego, J; Punzon, C; Duarte, M & Fresno, M. (1997). Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. *J. Immunol.* **159**: 4983-4989
- De Souza, W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharma. Des.* **8**: 269-285
- de Souza, A.P; Olivieri, B.P; de Castro, S.L & Araújo-Jorge, T.C (2000). Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. *Parasitol. Res.* **86**: 800-808

- Di Noia, J.M; Pollevick, G.D; Xavier, M.T; Previato, J.O; Mendoça-Previato, L; Sánchez, D.O & Frasch, A.C (1996). High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **13**: 32078-32083
- Dias, W.B; Fajardo, F.D; Graça-Souza, A.V; Freire-de-Lima, L; Vieira, F; Girard, M.F; Bouteille, B; Previato, J.O; Mendonça-Previato, L & Todeschini, A.R (2008). Endothelial cell signalling induced by *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell. Microbiol.* **10**: 88-99
- Dodd, R.Y, Notari, E.P & Stramer, S.L (2002). Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion.* **42**: 975
- DosReis, G.A; Freire-de-Lima, C.G; Nunes, M.P & Lopes, M.F. (2005). The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. *Trends. Parasitol.* **21**: 237-243
- dos Santos, P.V; Roffê, E; Santiago, H.C; Torres, R.A; Marino, A.P; Paiva, C.N; Silva, A.A; Gazzinelli, R.T & Lannes-Vieira, J (2001). Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.* **3**: 971-984
- Dzierszinski, F. S & Hunter, C. A (2008). Advances in the use of genetically engineered parasites to study immunity to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **30**: 235-244
- Ferguson, M.A (1997). The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **29**: 1295-1302

- Ford, M.L; Onami, T.M; Sperling, A.I; Ahmed, R & Evavold, B.D (2003). CD43 modulates severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **171**: 6527-6533
- Frasch, A.C (2000). Functional diversity in the *trans*-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* **16**: 282-286
- Frasch, A.C. (1994). *trans*-Sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. *Parasitology.* **108**: 37-44
- Freire-de-Lima, C.G; Nunes, M.P; Corte-Real, S; Soares, M.P; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L & DosReis, G.A. (1998). Proapoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by IFN-gamma. *J. Immunol.* **161**: 4909-4916
- Freire-de-Lima, C.G; Nascimento, D.O; Soares, M.B; Bozza, P.T; Castro-Faria-Neto, H.C; de Mello, F.G; DosReis, G.A & Lopes, M.F (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* **13**: 199-203
- Fuhlbrigge, R.C; King, S.L; Sackstein, R & Kupper, T.S (2005). CD43 is a ligand for E-selectin on CLA⁺ human T cells. *Blood.* **107**: 1421-1426
- Fuster, M.M & Esko, J.D (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* **5**: 526-542
- Galvan, M., Tsuboi, S., Fukuda, M & Baum, L. G (2000). Expression of a Specific Glycosyltransferase Enzyme Regulates T Cell Death Mediated by Galectin-1. *J. Biol. Chem.* **275**: 16730-16737
- Galvan, M; Murali-Krishna, K; Ming, L.L; Baum, L & Ahmed, R (1998). Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8⁺ T cells from naive cells. *J. Immunol.* **15**: 641-648

- Gao, W; Wortis, H.H; Pereira, M.A. (2002). The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int. Immunol.* **14**: 299-308
- Garg, N & Tarleton, R.L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection (2002). *Infect. Immun.* **70**: 5547–5555
- Garg, N; Tarleton, R.L & Mensa-Wilmot, K (1997). Proteins with glycosylphosphatidylinositol (GPI) signal sequences have divergent fates during a GPI deficiency. GPIs are essential for nuclear division in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem* **272**: 12482–12491
- Gillespie, W; Paulson, J.C; Kelm, S; Pang, M & Baum, L.G (1993). Regulation of alpha 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J. Biol. Chem.* **25**: 3801-3814
- Giordano, R; Fouts, D.L; Tewari, D; Colli, W; Manning, J.E & Alves, M.J (1999). Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J. Biol. Chem.* **5**: 3461-3468
- Golgher, D.B; Colli, W; Souto-Padrón, T & Zingales, B (1993). Galactofuranose-containing glycoconjugates of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **60**: 249-64
- Gomes, N.A; Previato, J.O; Zingales, B; Mendonca-Previato, L & DosReis, G.A (1996). Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. Assignment of the T cell-suppressive determinant to the ceramide domain. *J. Immunol.* **156**: 628-635

- Gonçalves, R.G; Gabrich, L; Rosário, A.Jr; Takiya, C.M; Ferreira, M.L; Chiarini, L.B; Persechini, P.M; Coutinho-Silva, R; Leite, M.Jr (2006). The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney Int.* **70**: 1599-1606
- Grabie, N; Delfs, M W; Lim, Y.C; Westrich, J.R; Luscinskas, F.W & Lichtman, A.H (2002). Beta-galactoside alpha2,3-sialyltransferase-I gene expression during Th2 but not Th1 differentiation: implications for core2-glycan formation on cell surface proteins. *Eur. J. Immunol.* **32**: 2766-2772
- Hahn, H.P; Pang, M; He, J; Hernandez, J.D; Yang, R.Y; Li, L.Y; Wang, X; Liu, F.T & Baum, L.G (2004). Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. *Cell. Death. Differ.* **11**: 1277-1286
- Harduin-Lepers, A; Recchi, M.A & Delannoy, P (1995). 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology.* **5**: 741-758
- Harduin-Lepers, A; Vallejo-Ruiz, V; Krzewinski-Recchi, M.A; Samyn-Petit, B; Julien, S & Delannoy, P (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie.* **83**: 727-737
- Hart, G.W (1992). Glycosylation. *Curr Opin Cell Biol.* **4**: 1017-1023
- Harth, G; Haidaris, C.G. & So, M. (1987) Neuraminidase from *Trypanosoma cruzi*: analysis of enhanced expression of the enzyme in the infectious forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 8320-8324
- Harty, J.T & Badovinac, V.P (2008). Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 107-119
- Hathcock, K.S; Laszlo, G; Pucillo, C; Linsley, P & Hodes RJ. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* **1**: 631-640

- Hattrup, C.L & Gendler, S.J (2008). Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Annu. Rev. Physiol.* **70**: 431-457
- Hernandez, J.D; Klein, J; Van Dyken, S.J; Marth, J.D & Baum ,L.G. (2007). T-cell activation results in microheterogeneous changes in glycosylation of CD45. *Int Immunol.* **19**: 847-856
- Hernandez-Caselles, T; Martinez-Esparza, M; Perez-Oliva, A.B; Quintanilla-Cecconi, A.M; Garcia-Alonso, A; Alvarez-Lopez, D.M & Garcia-Penarrubia, P. (2006). A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J. Leukoc. Biol.* **79**: 46-58
- Ikehara, Y; Ikehara, S.K & Paulson, J.C. (2004). Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9. *J. Biol. Chem.* **279**: 43117-43125
- Jones, C; Todeschini, A.R; Agrellos, O.A; Previato, J.O & Mendonça-Previato, L (2004). Heterogeneity in the biosynthesis of mucin O-glycans from *Trypanosoma cruzi* tulahuén strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides. *Biochemistry.* **43**: 11889-11897
- Jones, J; Krag, S.S & Betenbaugh, M.J (2005). Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim. Biophys. Acta.* **15**: 121-137
- Kim, D; Chiurillo, M.A; El-Sayed, N; Jones, K; Santos, M.R; Porcile, P.E; Andersson, B; Myler, P; da Silveira, J.F & Ramírez, J.L (2005). Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo)genes of retrotransposon hot spot and *trans*-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. *Gene.* **14**: 153-161
- Kotani, N; Asano, M; Inoue, N; Iwakura, Y & Takasaki S (2004). Polylactosamine synthesis and branch formation of N-glycans in beta1,4-galactosyltransferase-1-deficient mice. *Arch. Biochem. Biophys.* **15**: 258-265

- Kumar, S & Tarleton, R.L. (1998). The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite. Immunol.* **20**: 207-216
- Lanzavecchia, A & Sallusto, F (2000). Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*. **6**: 92-97
- Lasky, L.A (1994). Sialomucin ligands for selectins: a new family of cell adhesion molecules. *Princess. Takamatsu. Symp.* **24**: 81-90
- Lederkremer, R.M., Alves, M.J., Fonseca, G.C. and Colli, W (1976). A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigota). Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochim Biophys Acta*. **444**: 85-96
- Leguizamón, M.S; Mocetti, E; García Rivello, H; Argibay, P & Campetella, O (1999). *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system *in vivo*. *J. Infect. Dis.* **180**: 1398-1402
- Lopes, M.F; da Veiga, V.F; Santos, A.R; Fonseca, M.E & DosReis, G.A (1995). Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol.* **15**: 744-752
- Lucas, B.I; Stefanova, K; Yasutomo, N; Dautigny, N & Germain, R.N. 1999. Divergent changes in the sensitivity of maturing T cells to structurally related ligands underlies formation of a useful T cell repertoire. *Immunity* **10**: 367-376
- Maemura, K & Fukuda, M. (1992). Poly-N-acetyllactosaminyl O-glycans attached to leukosialin. The presence of sialyl Le(x) structures in O-glycans. *J. Biol. Chem.* **267**: 24379-24386

- Manjunath, N; Correa, M; Ardman, M & Ardman, B (1995). Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature*. **12**: 535-538
- Marino, J.H; Tan, C; Davis, B; Han, E.S; Hickey, M; Naukam, R; Taylor, A; Miller, K.S; Van De Wiele, C.J & Teague, T.K (2008). Disruption of Thymopoiesis in ST6Gal I Deficient Mice. *Glycobiology*. [Epub ahead of print]
- Martin, D.L; Weatherly, D.B; Laucella, S.A; Cabinian, M.A; Crim, M.T; Sullivan, S; Heiges, M; Craven, S.H; Rosenberg, C.S; Collins, M.H; Sette, A; Postan, M & Tarleton, R.L. (2006) CD8+ T cell responses to *Trypanosoma cruzi* are highly focused on strain-variant *trans*-sialidase epitopes. *Plos Pathog*. **2**: 731-740
- Masopust, D & Ahmed, R (2004). Reflections on CD8 T-cell activation and memory. *Immunol. Res*. **29**: 151-160
- Massad, E (2007). The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol. Infect*. **4**: 1-12
- Matarrese, P; Tinari, A; Mormone, E; Bianco, G.A; Toscano, M.A; Ascione, B; Rabinovich, G.A & Malorni, W (2005). Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *J Biol Chem*. **25**: 6969-6985
- McEvoy, L.M; Sun, H; Frelinger, J.G & Butcher, E.C (1997). Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J. Exp. Med*. **185**:1493-1498
- Minoprio, P (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int. J. Parasitol*. **1**: 588-591
- Minoprio, P.M; Eisen, H; Forni, L; D'Imperio Lima, M.R; Joskowicz, M & Coutinho, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection (1986). I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand. J. Immunol*. **24**: 661-668

- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **98**: 577-591
- Moody , A.M; Chui, D; Reche, P.A; Priatel, J.J; Marth, J.D & Reinherz, E.L (2001). Developmentally regulated glycosylation of the CD8alphabeta coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell*. **16**: 501-512
- Moody, A.M; North, S.J; Reinhold, B; Van Dyken, S.J; Rogers, M.E; Panico, M; Dell, A; Morris, H.R; Marth, J.D & Reinherz, E.L (2003). Sialic acid capping of CD8beta core 1-O-glycans controls thymocyte-major histocompatibility complex class I interaction. *J. Biol. Chem*. **28**: 7240-7246
- Mucci, J; Hidalgo, A; Mocetti, E; Argibay, P.F; Leguizamon, M.S & Campetella, O. (2002). Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by *trans*-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **99**: 3896-3901
- Mucci, J; Mocetti, E; Leguizamon, M.S & Campetella, O. (2005). A sexual dimorphism in intrathymic sialylation survey is revealed by the *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol*. **174**: 4545-4550
- Mucci, J; Risso, M.G; Leguizamón, M.S; Frasch, A.C & Campetella, O (2006). The *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cell Microbiol*. **8**: 1086-1095
- Nunes, M.P; Andrade, R.M; Lopes, M.F & DosReis, G.A (1998). Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *J. Immunol*. **1**: 1313-1319

- Nutku, E; Hudson, S.A & Bochner, B.S. (2005). Mechanism of Siglec-8-induced human eosinophil apoptosis: role of caspases and mitochondrial injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**: 918-924
- Oliveira, A.C; Peixoto, J.R; de Arruda, L.B; Campos, M.A; Gazzinelli, R.T; Golenbock, D.T; Akira, S; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L; Nobrega, A & Bellio, M. (2004). Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* **173**: 5688-5896
- Onami, T.M; Harrington, L.E; Williams, M.A; Galvan, M; Larsen, C.P; Pearson, T.C; Manjunath, N; Baum, L.G; Pearce, B.D & Ahmed, R (2002). Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J. Immunol.* **168**: 6022-6031
- Ostberg, J.R; Barth, R.K & Frelinger, J.G (1998). The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol. Today.* **19**: 546-550
- Pace, K.E; Lee, C; Stewart, P.L & Baum, L.G. (1999). Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J. Immunol.* **163**: 3801-38011
- Pappu, B.P & Shrikant, P.A (2004). Alteration of cell surface sialylation regulates antigen-induced naive CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol.* **1**: 275-284
- Pereira, M.E.A. (1983). A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*, **219**: 1444-1446
- Pereira, M.E; Loures, M.A; Villalta, F & Andrade, A.F (1980) Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. *J. Exp. Med.* **152**: 1375-1392

- Perillo, N. L., Uittenbogaart, C., Nguyen, J., & Baum, L. G (1997). Galectin-1, an Endogenous Lectin Produced by Thymic Epithelial Cells, Induces Apoptosis of Human Thymocytes. *J. Exp. Med.* **185**: 1851-1858
- Perillo, N.L; Pace, K.E; Seilhamer, J.J & Baum, L.G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. **378**: 736-739
- Peter, M.E; Hellbardt, S; Schwartz-Albiez, R; Westendorp, M.O; Walczak, H; Moldenhauer, G; Grell, M & Krammer, P.H (1995). Cell surface sialylation plays a role in modulating sensitivity towards APO-1-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* **2**: 163-171
- Phan, B.A.P, Laflamme, M.A, Stempien-Otero, A, Limaye, A. P, Buckner, F.S & Levy, W.C (2006). Confirmation of Chagas' cardiomyopathy following heart transplantation. *Hearth & Vessels*. **21**: 325-327
- Pollevick, G.D; Affranchino, J.L; Frasch, A.C.C. & Sanchez, D.O. (1991) The complete sequence of SAPA, a shed-acute phase antigen of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **47**: 247-250
- Pope, C; Kim, S. K; Marzo, A; Masopust, D; Williams, K; Jiang, J; Shen, H & Lefrançois L (2001) Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **166**: 3402-3409
- Prata, A. (1994). Chagas' Disease. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **8**: 61-76
- Previato, J.O., Jones, C. Xavier, M.T., Wait, R., Travassos, L.R., Parodi, A.J. & Mendonça-Previato, L (1995) Structural Characterization of the Major Glycosylphosphatidylinositol Membrane-anchored Glycoprotein from Epimastigote Forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. *J. Biol. Chem.* **270**: 7241-7250

- Previato, J.O; Andrade, A.F.B; Pessolani, M.C.V & Mendonça-Previato, L (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol*; **16**: 85-96
- Previato, J.O; Andrade, A.F.B; Vermelho, A; Firmino, J.C. & Mendonça-Previato, L (1990) Evidence for *N*-glycolylneuraminic acid incorporation by *Trypanosoma cruzi* from infected animal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **85**: 38
- Priatel, J.J; Chui, D; Hiraoka, N; Simmons, C.J; Richardson, K.B; Page, D.M; Fukuda, M; Varki, N.M & Marth, J.D (2000). The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity*. **12**: 273-283
- Punukollu, G; Gowda, R.M; Khan, I.A; Navarro, V.S & Vasavada, B.C (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol*. **14**: 279-283
- Qian, J.I; Cheng, C; Liu, H; Chen, J; Yan, M; Niu, S; Qin, J; Sun, L; Liu, L; Gu, J & Shen, A (2007). Expression of β -1,4-Galactosyltransferase-I in Rat during Inflammation. *Inflammation*. **30**: 59-68
- Rabinovich, G.A; Toscano, M.A; Jackson, S.S & Vasta, G.R (2007). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **17**: 513-520
- Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P (2000). Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today*. **16**: 62-67
- Reisner, Y; Ikehara, S; Hodes, M.Z & Good, R.A (1979). Allogeneic hemopoietic stem cell transplantation using mouse spleen cells fractionated by lectins: in vitro study of cell fractions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **77**: 1164-1168

- Reisner, Y; Itzicovitch, L; Meshorer, A & Sharon, N (1978). Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **75**: 2933-2936
- Renkonen, O (2000). Enzymatic in vitro synthesis of I-branches of mammalian polylectosamines: generation of scaffolds for multiple selectin-binding saccharide determinants. *Cell. Mol. Life. Sci.* **57**: 1423-1439
- Ribeirão, M; Pereira-Chiocola, V.L; Eichinger, D; Rodrigues, M.M. & Schenkman, S. (1997) Temperature differences for *trans*-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase. *Glycobiology*, **7**: 1237-1246
- Risso, M.G; Pitcovsky, T.A; Caccuri, R.L; Campetella, O & Leguizamón, M.S (2007). Immune system pathogenesis is prevented by the neutralization of the systemic *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* during severe infections. *Parasitology*. **134**: 503-510
- Rodrigues, M.M; Ribeirão, M; Pereira-Chiocola, V; Renia, L & Costa, F (1999) Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect Immun.* **67**: 3855-3863
- Rottenberg, M.E; Bakhiet, M; Olsson, T; Kristensson, K; Mak, T; Wigzell, H & Orn A. (1993). Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect. Immun.* **61**: 5129-5133
- Rudd, P.M; Elliott, T; Cresswell, P; Wilson, I.A & Dwek, R.A (2001). Glycosylation and the immune system. *Science*. **23**: 2370-2376

- Russel, J.H & Timothy, J.L (2002) Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 323-370
- Saavedra, E; Herrera, M; Gao, W; Uemura, H & Pereira, M.A (1999). The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, through its COOH-terminal tandem repeat, upregulates interleukin 6 secretion in normal human intestinal microvascular endothelial cells and peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* **20**: 1825-1836
- Sadighi Akha, A.A; Berger, S.B & Miller, R.A (2006). Enhancement of CD8 T-cell function through modifying surface glycoproteins in young and old mice. *Immunology.* **119**: 187-194
- Sano, G; Haffala, J.C; Morrot, A; Abe, R; Lafaille, J. J & Zavala, F (2001) Swift development of protective effector functions in naive CD8 T cells against malaria liver stages. *J. Exp. Med.* **194**: 173-180
- Saraiva, V.B; Gibaldi, D; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L; Bozza, M.T; Freire-De-Lima, C.G & Heise N (2002). Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**: 3472-3477
- Schauer, R; Reuter, G; Muhlpfordt, H; Andrade, A.F & Pereira, M.E (1983) The occurrence of *N*-acetyl- and *N*-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **364**: 1053-1057
- Schenkman, S & Eichinger, D (1993). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol. Today.* **9**: 218-222
- Schenkman, S; Eichinger, D; Pereira, M.E & Nussenzweig, V (1994). Structural and functional properties of *Trypanosoma trans*-sialidase. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 499-523

- Schenkman, S; Jiang, M.S; Hart, G.W & Nussenzweig V (1991). A novel cell surface *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*. **28**: 1117-1125
- Schenkman, S; Pontes de Carvalho, L & Nussenzweig, V (1992) *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J. Exp. Med.* **175**: 567-575
- Scudder, P; Doom, J.P; Chuenkova, M; Manger, I.D. & Pereira, M.E.A. (1993) Enzymatic characterization of β -D-galactoside α 2,3-*trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **268**: 9886-9891
- Shoreibah, M; Perng, G.S; Adler, B; Weinstein, J; Basu, R; Cupples, R; Wen, D; Browne, J.K; Buckhaults, P; Fregien N & Pierce, M. (1993). Isolation, characterization, and expression of a cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase V. *J. Biol. Chem.* **268**: 15381-15385
- Sperandio, M; Thatte, A; Foy, D; Ellies, L.G; Marth, J.D & Ley, K (2001). Severe impairment of leukocyte rolling in venules of core 2 glucosaminyltransferase-deficient mice. *Blood*. **15**: 3812-3819
- Srivastava G, Hindsgaul O. (1992). Synthesis of a tetrasaccharide acceptor for use in the assay of UDP-GlcNAc:beta-D-Galp-(1----4)-beta-D-GlcNAc (GlcNAc to Gal) beta(1----3)-N-acetylglucosaminyltransferase activity and the pentasaccharide product that would be formed by its enzymic glycosylation. *Carbohydr. Res.* **224**: 83-93
- Stambas, J; Doherty, P. C & Turner, S. J (2007). An *in vivo* cytotoxicity threshold for influenza A virus-specific effector and memory CD8 (+) T cells. *J. Immunol.* **1**:1285-1292

- Starr, T.K; Daniels, M.A; Lucido, M.M; Jameson, S.C & Hogquist, K.A (2003). Thymocyte sensitivity and supramolecular activation cluster formation are developmentally regulated: a partial role for sialylation. *J. Immunol.* **1**: 4512-4520
- Stemberger, C; Neuenhahn, M; Buchholz, V.R & Busch, D.H (2007). Origin of CD8⁺ effector and memory T cell subsets. *Cell Mol Immunol.* **4**:399-405
- Stockton, B.M; Cheng, G; Manjunath, N; Ardman, B & von-Andrian, U.H (1998). Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity.* **8**: 373-381
- Suzuki, O; Nozawa, Y & Abe, M (2003). Sialic acids linked to glycoconjugates of Fas regulate the caspase-9-dependent and mitochondria-mediated pathway of Fas-induced apoptosis in Jurkat T cell lymphoma. *Int J Oncol.* **23**: 769-774
- Tarleton R.L. (1990). Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **15**: 717-724
- Tarleton, R. L (2004). Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews.* **201**: 304-317
- Tarleton, R.L (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Opin. Immunol.* **19**: 430-434
- Tarleton, R.L. (1995). The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol. Today.* **11**: 7-9
- Tarleton, R.L; Koller, B.H; Latour, A & Postan, M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature.* **26**: 338-340

- Tarleton, R.L; Sun, J; Zhang, L & Postan, M (1994). Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun.* **62**: 1820–1829
- Todeschini, A.R., da Silveira, E.X., Jones, C. Wait, R., Previato, J.O. and Mendonça-Previato, L (2001). Structure of *O*-glycosidically linked oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* CL-Brener strain: evidence for the presence of O-linked sialyl-oligosaccharides. *Glycobiology.* **11**: 47-55
- Todeschini, A.R; Dias, W.B; Girard, M.F; Wieruszeski, J.M; Mendonca-Previato, L & Previato, J.O. (2004). Enzymatically inactive *trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds sialyl and beta-galactopyranosyl residues in a sequential ordered mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**: 5323-5328
- Todeschini, A.R; Nunes, M.P; Pires, R.S; Lopes, M.F; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L & DosReis, G.A. (2002). Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal *trans*-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J. Immunol.* **168**: 5192-5198
- Toscano, M.A; Bianco, G.A; Ilarregui, J.M; Croci, D.O; Correale, J; Hernandez, J.D; Zwirner, N.W; Poirier, F; Riley, E.M; Baum, L.G & Rabinovich, G.A (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.* **8**: 825-834
- Tyler K.M & Engman DM (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* **1**: 472-481
- Tzelepis, F; de Alencar, B.C; Penido, M.L; Gazzinelli, R.T; Persechini, P.M & Rodrigues, M.M (2006). Distinct kinetics of effector CD8⁺ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect. Immun.* **74**: 2477-2481

- Tzelepis, F; de Alencar, B.C; Penido, M.L; Claser, C; Machado, A.V; Bruna-Romero, O; Gazzinelli, R.T & Rodrigues, M.M (2008). Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8⁺ T cells leading to immunodominance. *J. Immunol.* **1**: 1737-1748
- Tzelepis, F; Persechini, P.M & Rodrigues, M.M (2007). Modulation of CD4⁺ T cell-dependent specific cytotoxic CD8⁺ T cells differentiation and proliferation by the timing of increase in the pathogen load. *PLoS ONE.* **25**: 393
- Yoshida, N (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol. Int.* **57**: 105-109
- Ujita, M; McAuliffe, J; Hindsgaul, O; Sasaki, K; Fukuda, M.N & Fukuda, M. (1999). Poly-N-acetyllactosamine synthesis in branched N-glycans is controlled by complemental branch specificity of I-extension enzyme and beta1,4-galactosyltransferase I. *J. Biol. Chem.* **274**: 16717-16726
- Van Dyken, S.J; Green, R.S & Marth, J.D (2007). Structural and mechanistic features of protein O glycosylation linked to CD8⁺ T-cell apoptosis. *Mol Cell Biol.* **27**: 1096-1111
- Varki, A (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.* **2**: 25-40
- Varki, A (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature.* **446**: 1023-1029
- Varki, A. (1997) Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB. J.* **11**: 248-255

- von Gunten, S; Yousefi, S; Seitz, M; Jakob, S.M; Schaffner, T; Seger, R; Takala, J; Villiger, P.M & Simon, H.U (2005). Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. *Blood*. **15**: 1423-1431
- Walzel, H; Blach, M; Hirabayashi, J; Kasai, KI & Brock, J. (2000). Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology*. **10**: 131-140
- Wherry, E.J; Teichgräber, V; Becker, T.C; Masopust, D; Kaech, S.M; Antia, R; Von Andrian, U.H & Ahmed, R (2003) Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature*. **4**: 225-234
- Wizel, B; Garg, N & Tarleton, R.L (1998). Vaccination with trypomastigote surface antigen-1- encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* **66**: 5073–5081
- Wizel, B; Nunes, M & Tarleton, R.L. Identification of a *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family member as a target of protective CD8⁺ Tc1 responses (1997). *J. Immunol.* **159**: 6120–6130
- Wu, W; Punt, J.A; Granger, L; Sharrow, S.O & Kearse, K.P (1997). Developmentally regulated expression of peanut agglutinin (PNA)-specific glycans on murine thymocytes. *Glycobiology*. **7**: 349-356
- Zambrano-Villa, S; Rosales-Borjas, D; Carrero J.C & Ortiz-Ortiz L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends. Parasitol.* **18**: 272-278
- Zhang, K; Baeckstrom, D; Brevinge, H & Hansson, G.C (1997). Comparison of sialyl-Lewis a-carrying CD43 and MUC1 mucins secreted from a colon carcinoma cell line for E-selectin binding and inhibition of leukocyte adhesion. *Tumour. Bio.* **18**: 175-187

Zhou, Q & Cummings, R.D. (1993). L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 6-17

Zhou, Y (2007). Regulatory T cells and viral infections. *Front. Biosci.* **1**: 1152-1170

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)