

Frederico Alisson da Silva

**Envolvimento do CD43 (Leucosialina) durante a
infecção experimental murina pelo
*Trypanosoma cruzi***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



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

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**Envolvimento do CD43 (Leucosialina) durante a infecção experimental
murina pelo *Trypanosoma cruzi***

Frederico Alisson da Silva

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Lucia Mendonça Previato

Prof^a. Dr^a. Adriane Regina Todeschini

Dissertação de Mestrado 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 mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Lucia Mendonça Previato
Professora Titular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Técia Maria Ulysses
Professora Titular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ
Presidente

Prof. Dr. Alexandre Morrot
Professor Adjunto, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, CCS – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Miriam Cláudia Pereira
Pesquisadora Titular, Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a. Dr^a. Marcela de Freitas Lopes
Professora Associada, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS – UFRJ
Revisor e Suplente interno

Prof^a. Dr^a. Maria Bellio
Professora Associada, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes
Suplente Externo

Rio de Janeiro
Março de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Alisson-Silva, Frederico

Envolvimento do CD43 (Leucosialina) durante a infecção experimental murina pelo *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro, UFRJ, IBCCF, 2009.

xv, 86 f.

Dissertação: Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

1. Leucosialina CD43 2. *Trypanosoma cruzi* 3. 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), Coordenadoria 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 dissertação em primeiro lugar à minha amada Carol, que me fez uma pessoa melhor nesses quatro anos que estamos juntos. Aprendi muito com seu jeito meigo, amoroso e paciente. Sou muito feliz por ter uma mulher como você do meu lado. Quero envelhecer podendo acordar com seu sorriso!

À minha mãe Isaura e ao meu pai João Bosco que mesmo à distância sempre confiaram e acreditaram em mim. O apoio e carinho de vocês me deixam confortável e tornam o dia a dia mais fácil. Queria um dia poder retribuir tudo que fizeram por mim...

À minha irmã Sylmara (agora mamãe do Lucas) e ao meu irmão Fabrício. Por mais que estejamos longe, irmão é sempre irmão.

Agradeço

À Professora Lucia Mendonça Previato que me orienta desde a iniciação científica. Se hoje sou mais maduro como pessoa e como estudante, em muito se deve à nossa convivência. Suas broncas e elogios me fizeram crescer. Não saberia escrever o carinho e a gratidão que tenho por você.

À minha querida orientadora Professora Adriane Todeschini. Uma mulher que admiro muito, pela competência e pela força com que encara as dificuldades. Conviver com a Adri é um prazer e uma sorte. Que bom que ainda tenho no mínimo quatro anos pra aprender com você.

Ao Professor José Osvaldo Previato no qual me espelho muito. Um exemplo de seriedade que nos transmite confiança e ensina a refletir sobre os experimentos. “Obrigado Zé”, por ter me ajudado durante todo esse tempo.

Agradeço, e muito, ao meu caro amigo Leonardo Freire de Lima com quem trabalhei durante a minha iniciação científica e em parte do mestrado. Nossas discussões sempre foram muito produtivas. Com você aprendi que sempre poderia fazer um pouco mais, me doar mais ao projeto e pensar em novos experimentos. Devo muito da minha dissertação a você meu irmão. Tomara que possamos trabalhar juntos de novo um dia.

Agradeço à minha revisora, Professora Marcela de Freitas Lopes por ter aceitado o nosso convite, pelas ótimas sugestões e pela paciência que teve ao rever comigo os resultados.

À Professora Cristina Takyia pela valiosa ajuda nos experimentos de histologia e pela paciência que tinha ao me explicar e re-explicar os protocolos.

Agradeço ao meu grande irmão Wallace pela força e incentivo que sempre me deu durante os quatro anos que dividimos o apartamento. Sem nossas “geladas” e churrasco o dia a dia não teria graça. Sem dúvida uma amizade que quero ter para o resto da vida.

Ao meu cunhado Rodrigo que sempre me ouviu. Nos momentos de indecisão, os conselhos (com a clareza que você tem) foram muito importantes.

Agradeço ao grande Tião, o sujeito mais “sossegado” que conheço. Esse cara torna o dia a dia de qualquer um mais divertido. Cada dia é um “ai ai

ai” num lugar diferente. Só ele conhece a arte de “enrolar” um casamento por mais de 15 anos. Como diria o Léo, esse cara é uma figura folclórica do CCS.

Aos bons amigos do laboratório de glicobiologia, Orlando (o carioca chato mais gente boa que conheci), Victor Saraiva (sem dúvida o baixinho mais marrento do CCS) e ao Daniel Gibaldi (muito gente “fina” apesar das frescuras típicas de tricolor). Valeu Orlandinho por me ajudar na hora dos apertos, Vitinho pelos conselhos e Gibaldi pelo “Black” nos congressos.

Agradeço muito àqueles que tornam a convivência no lab muito prazerosa, Luciana, Letícia, Danielzinho, Andréa, Suellen, Gilberto, Marcelo, Lana e Wagner (em especial pelas caronas e pelas dicas na reta final).

Agradeço às colegas do Laboratório de Biologia Imunitária Alessandra e Wânia pela paciência e por sempre me ajudarem no que precisava.

À doutoranda da UFMG Miriam Costa por nos receber tão bem em BH e pelo auxílio nas análises de PCR em tempo real.

Às minhas tias Dete e Verônica, tio Paulo e meu primo Tadeu (mano véio) que sempre me incentivaram muito. Ao tio Maurício pelas várias caronas do Rio pra BH.

Dedico esta dissertação a todos vocês

RESUMO

A infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi* apresenta como uma das principais características o intenso infiltrado inflamatório no miocárdio nos estágios iniciais da infecção. Assim, a elucidação de moléculas envolvidas no recrutamento de leucócitos para o coração de indivíduos infectados é essencial para elaboração de estratégias terapêuticas para miocardite chagásica crônica. A leucosialina CD43 é uma sialoglicoproteína altamente O-glicosilada abundante na superfície celular dos timócitos, linfócitos T e da maioria das células de linhagem linfohematopoiética. O CD43 está diretamente envolvido no contato entre células participando de uma série de eventos como sinalização, adesão, desordens auto-imunes, câncer e interações parasita hospedeiro, além de atuar como ligante de E-selectina durante o processo de recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios. Estudos prévios demonstraram que o CD43 presente na superfície dos linfócitos T é o receptor para *trans*-sialidase durante a infecção pelo *T. cruzi*. Nosso objetivo neste estudo foi avaliar o envolvimento do CD43 durante a infecção experimental murina pelo *T. cruzi* utilizando camundongos deficientes para CD43. Observamos que os animais CD43KO infectados apresentam um perfil de resposta de linfócitos TCD4⁺ do tipo Th₂, com aumento nos níveis de IL-4 secretados no sobrenadante de linfócitos T esplênicos e maior percentual de células TCD4⁺ produtoras de IL-4 se comparados aos animais selvagens infectados. Apesar do perfil Th₂, não observamos diferença na parasitemia entre os animais selvagens e CD43KO infectados; o que poderia ser explicado pela maior atividade citotóxica de linfócitos T obtidos de camundongos CD43KO. As análises de PCR em tempo real revelaram diminuição na carga parasitária tecidual dos animais deficientes em CD43. Adicionalmente, análises de citometria de fluxo e histopatologia revelaram que camundongos CD43KO infectados apresentaram redução no percentual e no número absoluto de leucócitos inflamatórios no tecido cardíaco e menor lesão tecidual. Observamos ainda, que a ausência do CD43 tornou os animais mais resistentes à doença de Chagas, com menor parasitismo tecidual e menor mortalidade. Corroborando com os dados obtidos durante a fase aguda, animais CD43KO, cronicamente infectados, apresentaram menor fibrose tecidual. Juntos, nossos resultados sugerem que o CD43 desempenha papel relevante na cardiomiopatia observada durante a infecção pelo *T. cruzi*, apresentando-se como um potencial alvo de intervenção terapêutica durante a fase aguda da doença de Chagas.

ABSTRACT

One characteristic of infection by *Trypanosoma cruzi* is the pronounced inflammatory process in the myocardium at the early stage of infection. Thus, elucidation of molecules involved in the recruitment of leukocytes to heart of infected hosts is an important step to elaborate strategies for therapeutic intervention in the chagasic cardiopathy. CD43 leukosialin is a large sialoglycoprotein abundantly express on the surface of thymocytes, T lymphocytes and most of cells from lymphohemopoietic lineage. The CD43 is directly involved in the contact between cells participating in a series of events such as signaling, adherence, auto-immune disorders, cancer and host parasite interactions, besides being a ligand for E-selectin during leukocytes recruitment to inflammatory sites. Previous studies have shown that the CD43 present on the surface of T lymphocytes is the receptor for *trans*-sialidase during infection with *T. cruzi*. During this study our aim was to evaluate the involvement of CD43 in the murine experimental infection by *T. cruzi* using CD43 deficient mice. We found that CD43KO infected mice displayed a Th₂ biased response, with increased levels of secreted IL-4 and high percent of IL-4 secreting TCD4⁺ in total splenic T cells when compared with their wild type littermates. Despite this Th₂ profile, no difference was observed in parasite blood levels between CD43KO and WT infected mice, which could be explained by the increased cytotoxicity of T lymphocytes obtained from CD43KO infected mice. In addition, analysis by histopathology and flow citometry revealed a decrease number of inflammatory cells in cardiac tissue of CD43KO infected mice and attenuated tissue damage. Also, we observed that the absence of CD43 become mice more resistant to Chagas' disease, with lower mortality and lower tissue parasitism. Corroborating the data obtained during the acute phase, CD43KO mice, chronically infected, had lower tissue fibrosis. Together, our results suggest that CD43 plays important role in the cardiomyopathy observed during *T. cruzi* infection, presenting as a potential target for therapeutic intervention during the acute phase of Chagas disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

α 2,3 ST 1 - *alfa* 2-3 sialiltransferase 1

AP-1 - *activator protein – 1* - proteína ativadora 1

APCs – *antigen presenting cells* – célula apresentadora de antígeno

Ca⁺⁺ - Cálcio

CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

DAF – *decay aggregation factor* – fator de decaimento de agregação

ERK – *extracellular signal regulated kinases* – cinase reguladora de sinal extracelular

ERM – enzirina, radixina e moesina

ESL-1 – *E-selectin ligand* - Ligante de E-selectina

Fab – *fragment antigen binding* – fragmento de ligação ao antígeno

Fas – receptor de morte

FasL – ligante de Fas

Gal β – *beta* galactose

G-CSF – *growth cell stem factor* – fator de crescimento para célula tronco

GlcNAc – *N*-acetilglucosamina

GPI - glicosilfosfatidilinositol

HeLa – homenagem a Henrietta Lacks da qual foi isolada célula tumoral de colo de útero

HIV – vírus da imunodeficiência humana

ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule* – molécula de adesão intercelular

Ig - imunoglobulina

IL - Interleucina

INF- γ interferon *gama*

kDa – kilo daltons

LPS - lipopolissacarídeo

MAdCAM – 1 - *addressin cell adhesion molecule 1* – molécula de adesão celular à adressina

MHC – complexo maior de histocompatibilidade

MOG – *myelin oligodendrocytic peptide*

NeuNAc – ácido *N*-acetil neuramínico

NF-AT – *nuclear factor of activated t cells* – fator nucleat de células T ativadas

NLS – domínio de sinalização para localização nuclear

NO – óxido nítrico

PBS – tampão salina fosfato

PMNL – leucócitos polimorfonucleares

PSGL-1 – *P selectin ligand protein 1* - Proteína de ligação a P-selectina

RANTES - *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted* – proteína regulada, expressa e secretada durante a ativação de célula T.

SNA – sistema nervosa autônomo

SNC – sistema nervosa central

SO₄⁻ - radical sulfato

TCR - receptor de célula T

Th1 – *T helper 1* – T auxiliary 1

Th2 – *T helper 2* - T auxiliary 2

TNF-β – fator de necrose tumoral beta

Treg – célula T regulatória

TSa - *trans*-sialidase ativa

TSi - *trans*-sialidase inativa

VCAM-1 – *vascular cell adhesion molecule 1* - molécula de adesão vascular

WASP – *Wiskott-Aldrich syndrome protein*

SUMÁRIO

1- Introdução	1
1.1- Doença de Chagas	1
1.2 - Agente causador e resumo epidemiológico recente	1
1.3 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	3
1.4 – Manifestações clínicas	4
1.5 – Mecanismos envolvidos na miocardite da doença de Chagas	6
1.6 – Resposta imune à infecção	7
1.6.1-Imunidade inata	7
1.6.2- Imunidade adquirida	10
1.7- Resposta de células TCD8 ⁺ durante a infecção chagásica experimental	12
1.8 – Imunomodulação por moléculas do <i>T. cruzi</i>	14
1.9 - A sialomucina CD43, distribuição e estrutura	15
1.10 – O CD43 no contato célula-célula	18
1.11 – Sinalização via CD43	19
1.12 – Mecanismos de recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios	23
1.13 – CD43 e inflamação	26
2 - Objetivos	28
2.1 – Objetivo geral	28
2.2 – Objetivos específicos	28
3 - Materiais e métodos	29
3.1 – Camundongos	29
3.2 – Parasitas e infecção	29
3.3 – Parasitemia e mortalidade	29
3.4 – Avaliação da lesão no tecido cardíaco	30
3.5 – Histologia	30
3.6 – PCR em Tempo Real	30
3.7 – Ensaio de citotoxicidade <i>ex vivo</i>	32
3.8 – Elisa para detecção de IL-4 e INF- γ em culturas de células T esplênicas	33
3.9 – Marcação de linfócitos T para citocina intracelular	33
3.10 – Obtenção de leucócitos infiltrantes no tecido cardíaco	34
3.11 – Tratamento de animais selvagens e CD43KO com a Tsi	35
3.12 – Avaliação do peso seco dos corações obtidos de animais cronicamente infectados	35
3.13 – Coloração para avaliação de deposição de fibras de colágeno	35

3.14 – Análises estatísticas-----	35
4 – Resultados -----	36
4.1 – Camundongos CD43KO infectados apresentam um perfil de resposta do tipo Th ₂ -----	36
4.2 – Influência do CD43 na infectividade do <i>T. cruzi</i> -----	38
4.3 – Ausência do CD43 favorece a atividade citotóxica mediada por linfócitos-----	39
4.4 – A carga parasitária é menor no tecido cardíaco de camundongos CD43KO-----	41
4.5 – Camundongos CD43KO são mais resistentes à infecção pelo <i>T. cruzi</i> -----	42
4.6 – Camundongos CD43KO apresentam redução no percentual de leucócitos infiltrantes no tecido cardíaco -----	43
4.7 – Envolvimento do CD43 na lesão do tecido cardíaco durante a infecção pelo <i>T.</i> <i>cruzi</i> -----	47
4.8 – O tratamento de animais infectados com a TSi diminui a lesão cardíaca em camundongos selvagens, mas não em camundongos CD43KO -----	49
4.9 – A cardite chagásica crônica diminui nos camundongos CD43KO-----	51
5 – Discussão -----	54
6 – Conclusões -----	59
7 – Perspectivas -----	60
8 – Referências bibliográficas -----	61

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMA

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	4
Figura 2: Estrutura e biossíntese de O-glicanas do CD43.....	17
Figura 3: Resumo de subpopulações de células TCD4 ⁺	21
Figura 4: Recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios.....	24
Esquema 1: Estrutura simplificada do tetrassacarídeo sialilado sialil Lewis.....	25
Figura 5: Análise do perfil de resposta T auxiliar em camundongos CD43KO e selvagens infectados com <i>T. cruzi</i>	37
Figura 6: Parasitemia em camundongos selvagens e CD43KO.....	38
Figura 7: Linfócitos esplênicos deficientes em CD43 apresentam maior atividade citotóxica.....	40
Figura 8: Quantificação da carga parasitária no tecido cardíaco.....	41
Figura 9: Ausência do CD43 torna os camundongos mais resistentes à infecção.....	42
Figura 10: Ausência do CD43 provoca diminuição no percentual de células infiltrantes no tecido cardíaco.....	44
Figura 11: Camundongos CD43KO apresentam redução no número absoluto de leucócitos infiltrantes.....	45 e 46
Figura 12: Avaliação da atividade plasmática da creatina quinase isotipo cardíaco (CK-MB).....	48
Figura 13: Efeito da TSi sobre a lesão cardíaca de camundongos selvagens e CD43KO infectados com <i>T. cruzi</i>	50
Figura 14: Avaliação do tamanho e peso seco dos corações de camundongos cronicamente infectados.....	52
Figura 15: Coloração por picrossírius para quantificação do colágeno total.....	53

**“ Run, rabbit run.
Dig that hole, forget the sun,
And when at last the work is done
Don't sit down it's time to dig another one.”**

Roger Waters

1. Introdução

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas permanece como um grande problema de saúde pública e é a maior causa de morbidade e mortalidade na América Latina. Passados 100 anos de seu descobrimento, o processo de patogênese da doença ainda não está completamente elucidado, o que se deve em grande parte à complexidade da relação parasita-hospedeiro (Marin-Neto, 2007). Durante a fase aguda da doença, a indução da ativação de linfócitos T é fundamental para defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *T. cruzi* (Rottemberg *et al.*, 1995; Tarleton *et al.*, 1996). Porém, sabe-se que o parasita induz uma expansão policlonal de células T antes mesmo que o sistema imune desenvolva uma defesa direcionada contra o *T. cruzi*. Essa condição leva a imunopatologias e representa um grande obstáculo para criação de vacinas (Reina-San-Martin *et al.*, 2000).

1.2 – Agente causador e resumo epidemiológico recente

A infecção pelo *T. cruzi*, inicialmente era restrita a pequenos mamíferos das matas e campos da América, desde a Patagônia até o sul dos Estados Unidos. Esses animais (tatus, gambás, roedores) convivem com insetos triatomíneos hematófagos (barbeiros) silvestres, e entre eles ainda hoje circula o *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 2007). Com a chegada do homem e os processos de colonização, aconteceram desequilíbrios ecológicos (desmatamentos, queimadas) e os barbeiros invadiram as habitações rústicas e pobres dos lavradores e colonos. A infecção chegou ao homem (doença de Chagas) e aos mamíferos domésticos. Existem pelo menos 15 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, com aproximadamente 100 milhões vivendo em regiões que as submetem ao risco de adquirir a doença (Coura *et al.*, 2002), sendo a maioria na América Latina (Moncayo *et al.*, 2006).

Graças ao programa de contenção da doença em países da América do Sul, a transmissão do *T. cruzi* por vetores ou por transfusão de sangue vem sendo eliminada com sucesso no Uruguai (desde 1997), Chile (desde 1999) e Brasil (desde 2005). Assim, a incidência global de novos humanos infectados por *T. cruzi* diminuiu 67% (Moncayo *et al.*, 2006). Em 9 de junho de 2006, o

Ministério da Saúde do Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão (por *Triatoma infestans*) da doença de Chagas conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde e pela Organização mundial de saúde. Apesar dos avanços alcançados nos controles vetoriais e transfusionais em países do Cone Sul, a doença de Chagas ainda representa um sério desafio, primeiro pela sua peculiar epidemiologia, caracterizada pela diversidade de situações de risco (grande número de vetores e reservatórios potenciais, variadas formas de infecção e diferentes estoques do parasito que circulam no ambiente domiciliar, peridomiciliar e silvestre), segundo por não dispor de medidas profiláticas e esquemas terapêuticos mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo e terceiro pela falta de um entendimento mais completo da fisiopatologia da evolução da doença crônica.

Em virtude das correntes migratórias cada vez mais freqüentes da América Ibérica para os Estados Unidos e o Canadá, existe a preocupação de que possa haver a introdução de números significativos de doadores soropositivos para doença contribuindo para o estoque de sangue contaminado durante a transfusão sanguínea ou transplante de órgãos (Tarleton *et al.*, 2007). Recentemente, foi relatada a transmissão do *T. cruzi* por via oral através do consumo de alimentos contaminados (Ianni & Mady, 2005; Yoshida *et al.*, 2008). O grupo que analisou este assunto recomendou a necessidade de se considerar à transmissão oral dentro do Programa Nacional de Prevenção e Controle da Doença de Chagas, bem como do Programa Nacional de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Assim esta doença continua sendo um sério problema de saúde pública entre as endemias rurais, e por incapacitar indivíduos em plena idade produtiva. Embora tenha sido classificada como potencial “candidata” à eliminação e/ou erradicação mundial, a doença de Chagas ainda não pode ser prontamente eliminada com as formas atuais de controle, havendo necessidade de se expandir e sustentar os esforços de controle epidemiológico além de se desenvolver soluções mais definitivas, incluindo aquelas relacionadas à quimioterapia (De Souza *et al.*, 2006).

1.3 – Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é complexo e envolve estágios de desenvolvimento morfológicamente distintos que se alternam entre dois hospedeiros, um inseto hematófago (barbeiro) e espécies de mamíferos (Brener, 1973; Tyler & Engman, 2001).

Quando o inseto hematófago suga o sangue de um mamífero contaminado com as formas tripomastigotas não replicativas, tem início o ciclo de desenvolvimento característico do *T. cruzi*. Na porção anterior do trato digestivo do inseto essas formas tripomastigotas diferenciam-se em formas epimastigotas, replicativas, sendo exclusivas do hospedeiro invertebrado e não infectivas para mamíferos. Após migrarem para o intestino posterior do triatomíneo, os epimastigotas sofrem metamorfoses, diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos, não replicativos, capazes de infectar o hospedeiro mamífero. Durante o repasto sanguíneo do vetor infectado, as formas tripomastigotas metacíclicas, liberadas nas fezes do inseto, atravessam a pele ou mucosas através de uma descontinuidade. As formas infectivas são altamente móveis e capazes de penetrar em diferentes células nucleadas de mamíferos, preferencialmente células do sistema fagócito mononuclear (Brener, 1973; Andrade & Andrews, 2005).

Assim, no citoplasma da célula hospedeira, os tripomastigotas diferenciam-se em amastigotas, replicativos, encontrados exclusivamente no hospedeiro mamífero. Após sucessivos ciclos de divisão binária, os amastigotas diferenciam-se em formas tripomastigotas, que serão liberados no espaço intercelular, após o rompimento da membrana da célula hospedeira. Estas formas podem atingir a corrente sangüínea, invadir novas células, ou serem ingeridas pelo inseto vetor durante seu repasto, completando o ciclo biológico de transmissão do *T. cruzi* (Hoare, 1972; Brener, 1973; Tyler & Engman, 2001). O ciclo de vida está resumido na figura 1.

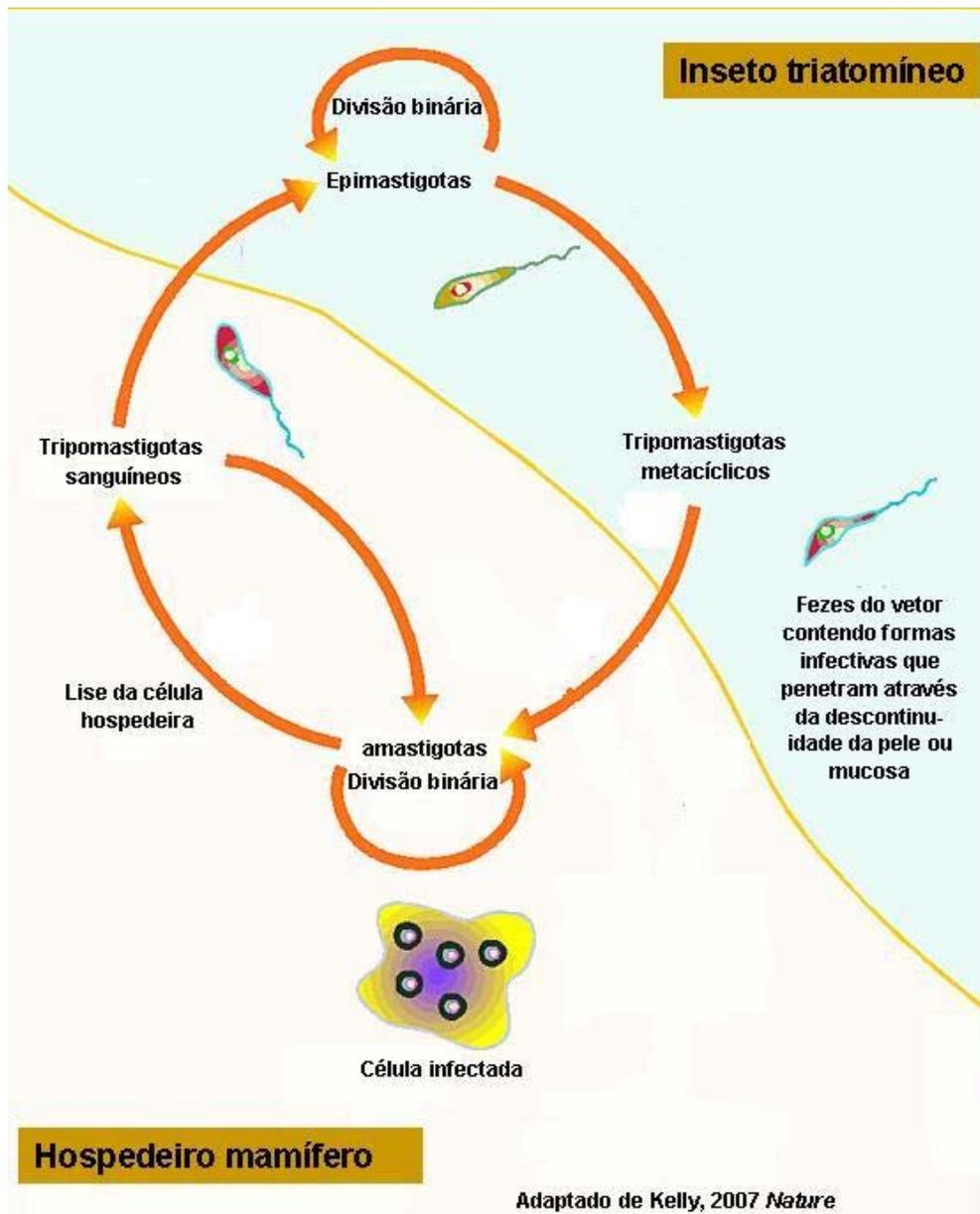


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*.

1.4 – Manifestações clínicas

As apresentações clínico-patológicas da doença de Chagas no homem são divididas em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda corresponde ao período inicial da infecção pelo *T. cruzi* no mamífero, podendo ser aparente ou não. Nessa fase, a parasitemia é evidente, e pode ser observada por exames parasitológicos diretos do sangue. As formas amastigotas do *T. cruzi* são encontradas em vários tecidos, como na camada muscular de vários segmentos do tubo digestivo, no miométrio, nas paredes da veia central da supra renal, na musculatura estriada em geral e no sistema nervoso central

(SNC) (Rossi & Ramos, 1996). Na maioria dos casos não há sintomas, mas nos casos sintomáticos há sinais de inoculação (chagoma ou sinal de Romanã) com febre e, em casos graves adenopatia generalizada, edema, hepatosplenomegalia, meningoencefalite e miocardite (Coura 2007). Clinicamente, no coração, a doença de Chagas aguda se caracteriza por uma intensa miocardite onde a evolução dos infiltrados focais ou difusos se faz lentamente, com tendência à insuficiência cardíaca. No SNC há meningoencefalite difusa nos casos mais graves (Brenner, 2000). Esta fase inicial pode ser seguida por uma fase crônica que, na maioria dos casos se apresenta como uma forma indeterminada (assintomática, com resultados normais de eletrocardiograma e raio-X do coração, esôfago e cólon), que pode evoluir para a forma cardíaca e/ou digestiva (megaesôfago, megacólon (Coura, 2007). A transição da infecção aguda para a crônica é determinada pelo desenvolvimento de imunidade adquirida, que é altamente efetiva em controlar ambos, parasitismo tecidual e sanguíneo. Assim, com o desenvolvimento das respostas imunes específicas ao parasito, a vasta maioria dos ninhos de amastigotas é eliminada dos tecidos, o foco necrótico é regenerado e a parasitemia cai para níveis indetectáveis de tripomastigotas na corrente sanguínea (Brenner *et al.*, 2000).

A fase crônica cardíaca é a mais expressiva manifestação da doença de Chagas, tanto por causa de sua frequência quanto sua gravidade. Ela geralmente aparece entre a segunda e quarta décadas de vida, de cinco a quinze anos após a infecção inicial (Coura, 2007). Durante essa fase, ciclos assintomáticos de infecção celular podem ocorrer por vários anos e em alguns pacientes, a patologia pode re-emergir e as lesões afetarem irreversivelmente órgãos do sistema nervoso periférico, digestivo e principalmente o coração, sendo a cardiomiopatia uma das mais sérias e frequentes manifestações da doença de Chagas crônica (Rossi & Ramos, 1996).

Vários estudos sugerem que, na infecção pelo *T. cruzi*, o controle local do parasitismo por linfócitos T efetores gera necessariamente um grau de lesão tecidual associado ao recrutamento de células inflamatórias.

1.5 – Mecanismos envolvidos na miocardite da doença de Chagas

A persistência de parasitas no coração, a resposta autoimune e o desbalanço da autonomia cardíaca são as principais hipóteses para a patógenese da cardiomiopatia chagásica crônica (Rossi *et al.*, 1995). Porém, atualmente, a teoria mais aceita é a de que os danos cardíacos sejam resultantes de uma resposta imune efetora induzida por parasitas persistentes no tecido (Tarleton and Zhang, 1999). Contudo, a necessidade da presença dos parasita, não exclui o papel agravante adicional da resposta autoimune (Girones & Fresno, 2003; Leon & Engman, 2003). Isto poderia estar relacionado ao mimetismo molecular entre o parasita e antígenos próprios ou pela liberação e apresentação de antígenos próprios derivados de células danificadas pela infecção (revisito por DosReis *et al.*, 2005). Uma das características mais marcantes da doença de chagas é o evidente infiltrado inflamatório no miocárdio nos estágios iniciais da infecção (Rossi *et al.*, 1995; Parada *et al.*, 1997). Estudos apontam que os sintomas e os sinais clínicos que ocorrem durante a fase inicial estão positivamente correlacionados com a cardiomiopatia chagásica crônica (Dias, 1989; Rossi *et al.*, 1995).

Estudos utilizando biópsias de endomiocárdio de pacientes chagásicos crônicos demonstraram que a evolução clínica da doença se deu em consequência da destruição contínua das fibras cardíacas, fibrose, hipertrofia compensatória e redução de performance (Higuchi *et al.*, 1987).

Baseado nessas observações é plausível propor que as alterações nas funções cardíacas que ocorrem durante a fase crônica sejam consequência da miocardite induzida durante a fase aguda (Michailowsky *et al.*, 2004). Portanto, a elucidação de moléculas que controlam o recrutamento inicial de leucócitos e consequentemente a intensidade da miocardite aguda é importante para a elaboração de novas estratégias terapêuticas (Lannes-Vieira, 2003; Teixeira *et al.*, 2002).

Vários estudos têm salientado o papel primário da inflamação durante a patogênese da doença de chagas. Em camundongos infectados, tal processo inflamatório é composto de linfócitos, predominantemente CD8⁺ (Sun and Tarleton, 1993), monócitos, macrófagos e eosinófilos. Há ainda a associação da expressão de citocinas e da óxido nítrico sintase induzida (Chandrasekar *et*

al., 1998; Huang *et al.*, 1999). Adicionalmente, o aumento da expressão de moléculas de adesão vascular tem sido descritas tanto no endotélio cardíaco como no soro de camundongos e humanos infectados (Laucella *et al.*, 1996). Tanowitz e colaboradores em 1990 apontaram o endotélio vascular como alvo da invasão do *T. cruzi*, e anos mais tarde, Huang e colaboradores demonstraram que a infecção de células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVEC) levou a ativação de NF- κ B e aumento da expressão de VCAM e E-selectina, bem como ao aumento da expressão do RNAm de ICAM-1 (Huang *et al.*, 1999). Mais recentemente, Michailowsky e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes para ICAM-1 apresentavam diminuição na migração de linfócitos T para o coração, tornando o hospedeiro mais susceptível à infecção (Michailowsky *et al.*, 2004). Estes estudos demonstram que, embora essencial para o controle do parasita, a resposta imune pode contribuir para a patogênese na doença de Chagas.

1.6 - Resposta imune à infecção

1.6.1 - Imunidade inata

O sucesso da sobrevivência do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado depende principalmente da sua capacidade de penetrar e multiplicar-se no interior das células e evadir o sistema imunológico (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

No curso da infecção chagásica, um conjunto de proteínas séricas pertencentes ao sistema complemento são ativadas pela imunidade inata ou natural. Enquanto as formas não infectivas (epimastigotas) do parasita são destruídas rapidamente, as formas infectivas (tripomastigotas) são resistentes a ação lítica do complemento. Esta resistência está relacionada com a expressão de proteínas na superfície do parasita como é o caso da gp160, que apresenta propriedades semelhantes ao fator de aceleração de decaimento (DAF ou CD55) humano. Assim como o DAF, a gp160 pode ligar-se a C3b e C4b e inibir a posterior ligação de outros membros pertencentes a cascata do complemento, evitando desta maneira a formação da C3 convertase e a subsequente lise do parasita (Norris *et al.*, 1991). Além do sistema

complemento, dentro da imunidade inata, um conjunto de células desempenham um papel fundamental na proteção contra o parasita.

O uso de modelos murinos experimentais tem mostrado que a resistência inata do hospedeiro contra o parasita depende parcialmente de células como a natural killer (NK), macrófagos (MΦ) e células dendríticas (DC), que são aptos a produzirem uma gama de citocinas como a interleucina-12 (IL-12), interferon gama (IFN- γ) e o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α) (Reed, 1998).

A invasão das células do hospedeiro, especialmente de macrófagos, pelo *T. cruzi* inicia a resposta inata. Este processo é iniciado por macrófagos que secretam as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12, esta última por sua vez ativa células NK a secretar IFN- γ (interferon- γ). O IFN- γ age reciprocamente sobre macrófagos, ativando-os para uma atividade microbicida. Camargo e colaboradores (1997) demonstraram que a âncora GPI de mucinas de tripomastigotas e amastigotas está envolvida na síntese das citocinas pró-inflamatórias interleucina-12 (IL-12) e TNF- α em macrófagos, efeito este que é potencializado por IFN- γ . O papel do TNF- α na resposta inata do hospedeiro é complexo, levando a efeitos tanto deletérios como protetores. O TNF- α juntamente com o IFN- γ induz a produção de óxido nítrico (NO) e a eliminação parcial de formas intracelulares do parasita (Muñoz-Fernandes *et al.*, 1992). Macrófagos de animais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* secretam altos níveis de TNF- α se comparados com macrófagos de animais resistentes.

Apesar destas citocinas pró-inflamatórias desencadarem um papel fundamental no curso da infecção chagásica, sabe-se, que em excesso, tornam-se tóxicas para o hospedeiro. Sendo assim, é importante que haja uma resposta auto-regulatória, que pode ser mediada por citocinas como IL-10 e TGF- β . Vários trabalhos demonstram a função auto-regulatória desta citocina. A infecção de camundongos deficientes em IL-10 com a cepa Tulahuen de *T. cruzi*, demonstrou diminuição do número de parasitas circulantes, assim como uma queda da carga parasitária no tecido cardíaco. No entanto, os animais apresentam morte precoce devido aos danos causados pelo excesso de IL-12, IFN- γ e TNF- α (Holscher *et al.*, 2000). Por outro lado, o TNF- α tem ainda um importante papel no processo preparatório da imunidade adquirida, induzindo a

maturação final e migração de células dendríticas da pele e mucosas para órgãos linfóides, onde iniciarão a ativação e expansão de clones de linfócitos específicos para antígenos microbianos (revisto por DosReis, 1997). Apesar de sua atividade microbicida, *in vitro*, a injeção de TNF- α aumenta a mortalidade de animais infectados (Black *et al.*, 1989). No entanto, a exposição crônica ao TNF- α suprime as funções de linfócitos T, *in vivo* e *in vitro*, atenuando a sinalização intracelular mediada pelo engajamento com o receptor da célula T (TCR).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, células dendríticas imaturas, que residem em muitos tecidos e órgãos são capazes de capturar e processar antígenos. Após sua maturação, estas células migram para os linfonodos ou baço, onde elas ativam células antígeno-específicas. Durante esta migração, elas passam por um processo de maturação, que constitui uma etapa crucial para o desenvolvimento de potentes APCs. Durante a maturação, as células dendríticas perdem a capacidade de capturar e processar antígenos e aumentam a expressão de MHC classe II, moléculas co-estimulatórias (CD40, CD80, CD86), moléculas de adesão (CD54/ICAM-1), e a secreção de IL-12 (Moll, 2003). Células dendríticas maduras também secretam quimiocinas como proteína quimioatraente para monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β , IL-8 e RANTES, favorecendo o recrutamento e a ativação de leucócitos (Caux *et al.*, 2000). Além disso, também são capazes de regular a expressão de receptores como CCR7 e CXCR4, que medeiam sua migração para órgãos linfóides secundários (Caux *et al.*, 2000). No contexto da co-estimulação, Planelles e colaboradores demonstraram em 2003 que a infecção por *T. cruzi* em camundongos Balb/c (susceptíveis), mas não C57Bl6 (B6) (resistentes) leva à diminuição da expressão de CD86 e CD40 em células dendríticas, sugerindo a importância no sucesso da co-estimulação para a resistência do hospedeiro à infecção (Planelles *et al.*, 2003).

Recentemente, Chaussabel e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos infectados com o *T. cruzi* apresentavam um relevante número de células dendríticas CD11c⁺ no baço, e baixos níveis de CD86. Ao contrário, camundongos tratados com LPS quando comparados aos não tratados, apresentavam altos níveis de expressão da molécula co-estimulatória. Estes dados indicam, que no curso da infecção chagásica, as células dendríticas

apresentam alterações tanto na migração quanto na maturação, impossibilitando desta maneira uma efetiva ativação de células T antígeno específicas. Resultados semelhantes já haviam sido obtidos por Van-Overtvelt e colaboradores (1999), que evidenciaram que células dendríticas maturadas pelo tratamento com LPS, mas infectadas ou incubadas em meio oriundo de cultivo do *T. cruzi* apresentavam deficiência na secreção de IL-12, IL-6 e TNF- α . Além disso, também foi observado que as células perderam sua capacidade de expressar MHC II e CD40. Estes resultados sugerem que proteínas secretadas pelo parasita durante o curso da infecção podem proporcionar um eficiente mecanismo de evasão, comprometendo a funcionalidade das células dendríticas.

1.6.2 - Imunidade adquirida

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por uma ativação policlonal de células B e T (Minoprio *et al.*, 1986), contribuindo na fisiopatologia da infecção e no desenvolvimento de uma resposta auto-imune (Minoprio *et al.*, 1988). A presença de vários clones inespecíficos de células B leva a uma hiperprodução de imunoglobulinas, no entanto, a resposta contra antígenos parasitários representa apenas uma pequena fração da Ig total produzida, sendo detectados anticorpos autorreativos (Minoprio *et al.*, 1987). Apesar de todos os isotipos de Igs apresentarem-se elevados, os isotipos IgG2 em camundongos e IgG1 em humanos são dominantes. Embora a maior parte da estimulação de células B durante a infecção pelo *T. cruzi* pareça dependente de células T, moléculas expressas pelo parasita podem induzir a mitogênese de linfócitos B. Bento e colaboradores (1996) demonstraram a ação mitogênica do glicoinositol fosfolípídeo (GIPL) de *T. cruzi* sobre as células B quando em presença de citocinas ou outros co-estímulos. Adicionalmente, resultados obtidos por Gao e colaboradores (2002) demonstraram que a porção C-terminal de proteínas da família da *trans*-sialidase foi capaz de ativar células B, induzindo a produção de anticorpos não específicos contra a enzima.

Os linfócitos T desempenham grande relevância durante a infecção chagásica. A vital importância desta população de células foi determinada pelo uso de anticorpos monoclonais anti-TCD4⁺/TCD8⁺, ou por mutação gênica. Os

dados obtidos *in vivo* demonstraram que a ausência de uma das subpopulações desencadeia alta parasitemia e morte precoce em animais resistentes ao parasita (Tarleton, 1995).

A importância dos subsets de células T (TCD4⁺ e TCD8⁺) no controle da proliferação do parasita em diferentes órgãos foi avaliado por Russo e colaboradores (1996) utilizando anticorpos monoclonais anti-MHC II, anti-CD4⁺ e anti-CD8⁺. No trabalho, os autores observaram que a administração de anticorpos anti-MHC II e anti-CD4⁺ contribuíram para o aumento da carga parasitária no coração e fígado dos animais infectados. Todavia, o tratamento dos animais com anti-CD8⁺ aumentou a carga parasitária somente no fígado. Nenhum aumento significativo foi observado no coração dos animais infectados e tratados com anti-CD8⁺, sugerindo que a atividade de diferentes subsets de células T contra o parasita varia de acordo com o órgão infectado, com a cepa do *T. cruzi* e com a linhagem de camudongos utilizados.

Foi demonstrado que linfócitos T CD8⁺ são predominantes em lesões inflamatórias crônicas em camundongos e humanos, com um baixo percentual de células T CD4⁺ (Tarleton, 1995). Desta forma os danos teciduais e a fibrose observada seriam consequência do papel destrutivo das células T CD8⁺ e seus produtos. Porém, as células T CD4⁺ seriam necessárias para a ação de células T CD8⁺ já que a depleção de células T CD4⁺ diminui as respostas inflamatórias no coração durante a fase crônica da doença (Tarleton, 1995).

Tais resultados reforçam os dados descritos na literatura, revelando que a distribuição de linfócitos nos diferentes tecidos inflamados não é aleatória. Essa migração de leucócitos depende das interações com o endotélio e com a matriz extracelular, sendo as moléculas de adesão as responsáveis pela regulação destas interações (Springer, 1994).

Apesar da ativação policlonal *in vivo*, ocorre uma marcante imunossupressão durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, evidenciada por métodos distintos. Durante a imunossupressão a produção da citocina mitogênica de linfócitos IL-2, produzida pela população de linfócito Th1, está significativamente reduzida (Tarleton, 1988) e foi demonstrada a redução na expressão de fatores nucleares que levam a transcrição do gene da IL-2 (Soong & Tarleton, 1994). Outro mecanismo para a regulação da vasta população de linfócitos ativados seria sua eliminação por apoptose (AICD:

activation induced cell death). Neste sentido, Lopes e colaboradores (1995) verificaram que linfócitos T CD4⁺ de camundongos infectados apresentaram uma resposta mitogênica diminuída em comparação com células de animais normais quando submetidos à estimulação via TCR/CD3. Estes estímulos provocaram morte por apoptose nestas células notando-se uma correlação direta entre a diminuição da proliferação e a AICD (Lopes & DosReis, 1996). Dados posteriores indicaram que a via Fas (CD95) de indução de morte celular participa na apoptose de células T CD4⁺ na doença de Chagas experimental (Lopes *et al.*, 1999). A molécula Fas é um receptor que induz apoptose quando engajado pelo seu ligante (FasL), presente em células T recém ativadas. A estimulação antigênica de células T cronicamente ativadas induz a expressão de Fas e FasL, resultando na morte entre linfócitos, um importante mecanismo de imunorregulação, que elimina preferencialmente células T CD4⁺ e linfócitos B ativados no final da resposta imune. Foi observado que a morte celular via Fas elimina a maior parte das células T CD4 produtoras de IFN- γ na fase aguda da infecção, e que a indução de AICD potencializa a replicação de formas infectantes do *T. cruzi* em monocamadas de macrófagos (Nunes *et al.*, 1998; Freire-de-Lima *et al.*, 2000).

1.7 – Resposta de células TCD8⁺ durante a infecção chagásica experimental

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). As proteínas do parasita assim como todas as proteínas plasmáticas, são sensíveis à degradação mediada por enzimas do proteossoma, permitindo que peptídeos resultantes oriundos do parasita se associem às moléculas de MHC do tipo I e sejam expressas como complexos peptídeo-MHC na superfície celular. Os linfócitos TCD8⁺ 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 TCD8⁺ 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, 1992; Rottenberg, 1993 e Tarleton, 1990). Foi demonstrado ainda que a importância de células TCD8⁺ não é restrita à fase aguda da infecção, uma vez que a depleção destas células em camundongos cronicados resultou no aumento da carga parasitária e resposta inflamatória exacerbada (Tarleton, 1994). Dos Santos *et al.*, (2001) demonstraram que as células TCD8⁺ presentes no miocárdio de camundongos cronicamente infectados apresentavam um fenótipo CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} e que este fenótipo contribuía para a persistência destas células no tecido cardíaco uma vez que Andrade *et al.*, (1989) haviam demonstrado que a expressão de fibronectina (ligante para VLA-4) era aumentada na matriz extracelular de cardiomiócitos durante a fase aguda e a fase crônica da doença de Chagas. Mais recentemente, Leavey e Tarleton (2003) demonstraram que a maioria das células TCD8⁺ presentes nos tecidos musculares, em especial no coração, apresentavam marcadores de superfície característicos de células de memória e de células efetoras, porém, apresentaram função efetora atenuada se comparadas as células TCD8⁺ esplênicas. Os autores sugeriram que a disfunção observada nessas células pode ser causada pela persistência do *T. cruzi*, por componentes inibitórios liberados pelo próprio músculo cardíaco ou uma combinação destes fatores.(Leavey & Tarleton , 2003).

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; Wizel, 1997). Dentre tais moléculas, pode-se destacar proteínas pertencentes à superfamília da *trans*-sialidase (TS), uma vez que respostas mediadas por linfócitos T CD8⁺ durante a infecção pelo *T. cruzi* são, em grande parte, direcionadas contra epítopos 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 (Wizel *et al.*, 1997). Estudos de imunização utilizando este (Wizel *et al.*, 1998), e outros peptídeos pertencentes à superfamília da TS sob condições capazes de induzir resposta mediada por células TCD8⁺, 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 moléculas do parasita são importantes para a geração de resposta imune protetora durante a infecção pelo *T. cruzi*.

1.8 – Imunomodulação por moléculas do *T. cruzi*.

O *T. cruzi* libera no meio extracelular uma série de moléculas que interferem com a ativação de células T, tais como mitógenos e co-estimulantes. Juntas, essas moléculas podem induzir imunossupressão auxiliando o escape do parasita (DosReis *et al.*, 2005). Entre as moléculas liberadas pelo *T. cruzi* está a *trans*-sialidase (TS), uma enzima ligada a superfície das formas tripomastigotas através de uma âncora de glicosilinositolfosfolípídeo (GPI). Durante a fase aguda da infecção chagásica é possível detectar no soro de pacientes infectados uma elevada quantidade de TS circulante (Cazzulo & Frasch, 1992). Vários trabalhos demonstraram o envolvimento da TS na invasão da célula hospedeira (Schenkman *et al.*, 1991, Burleigh *et al.*, 1995) e como fator de virulência solúvel (Chuenkova & Pereira, 1995). A *trans*-sialidase pertence a uma família de proteínas codificadas por mais de 140 genes (Cremona *et al.*, 1999) e dentro da mesma família são encontradas formas enzimaticamente ativas (TSa) e enzimaticamente inativas (TSi). Enquanto a TSa apresenta na posição 342 uma tirosina (Tyr³⁴²), a TSi

apresenta uma histidina na mesma posição (His³⁴²) (Cremona *et al.*, 1995). A TSa é uma sialidase única, capaz de transferir unidades de ácido siálico α -2,3 ligados a β -galactopiranosose presentes em sialoglicomoléculas exógenas para moléculas do tipo mucina na superfície do parasita (Previato *et al.*, 1985 e 1990; Schenkman *et al.*, 1991).

Em 2002, nosso grupo demonstrou que ambas as formas, ativa e inativa da TS, são capazes de se ligar ao CD43 presente na superfície de linfócitos TCD4⁺. Foi proposto que a TS é um ligante natural do CD43 funcionando como co-estímulo para os linfócitos T, aumentando a atividade mitogênica via proteína cinases, produção de citocinas como IL-2 e TNF- α . No mesmo trabalho, os autores observaram que a interação da TS com o CD43 foi, ainda, capaz de proteger células TCD4⁺ isoladas de camundongos infectados da morte celular induzida por ativação (Todeschini *et al.*, 2002). Por outro lado, Mucci e colaboradores (2002) demonstraram que a administração da TSa foi capaz de induzir a apoptose de timócitos e células T maduras em camundongos selvagens não infectados mas não em camundongos deficientes em CD43.

Baseado no fato de que a TS do *T. cruzi* se liga ao CD43 das células do hospedeiro e de que a sinalização via tal glicoproteína está envolvida na montagem de respostas inflamatórias e modulação da apoptose, seria interessante avaliar de maneira mais elaborada a importância do CD43 durante a infecção pelo *T. cruzi*.

1.9 - A sialomucina CD43, distribuição e estrutura

O CD43 é a sialoglicoproteína (leucosialina) mais abundante na superfície celular dos timócitos e dos linfócitos T, os quais apresentam cerca de 10⁵ moléculas/célula (Gahmberg *et al.*, 1976; Remold-O'Donnell *et al.*, 1987; Cyster *et al.*, 1991). Também está presente na superfície de neutrófilos, células tronco de medula e em linfócitos B ativados (Dyer & Hunt, 1981; Gulley *et al.*, 1988; Wiken *et al.*, 1988; Stross *et al.*, 1989). Embora a expressão seja normalmente restrita a leucócitos, o CD43 pode estar presente em carcinomas e adenocarcinomas de cólon e em vários tipos de células não hematopoiéticas (Sikut *et al.*, 1997; Fernandez-Rodriguez *et al.*, 2002).

O CD43 é uma glicoproteína transmembrana com o domínio citoplasmático altamente conservado entre as espécies, contendo 123 ou 124 aminoácidos. Este domínio apresenta três sítios conservados de fosforilação para proteína cinase C (Pallant *et al.*, 1989; Cyster *et al.*, 1990) e uma seqüência rica em prolinas com homologia à região de ligação a proteínas da família Src (Pedraza-Alva *et al.*, 1996). Trabalhos mais recentes identificaram ainda no domínio citosólico, uma seqüência funcional de sinalização para localização nuclear (NLS) (Andersson *et al.*, 2004 e 2005).

A leucosialina apresenta um único domínio transmembrana em hélice, constituído por 23 aminoácidos e um domínio extracelular constituído respectivamente por 224, 229 ou 234 aminoácidos em ratos (Killeen *et al.*, 1987), camundongos (Cyster *et al.*, 1990) e humanos (Pallant *et al.*, 1989; Shelley *et al.*, 1989). O domínio extracelular apresenta uma estrutura clássica de mucinas, sendo extensivamente modificado por 70-80 cadeias polissacarídicas O-ligadas a unidades de serina e/ou treonina. Por outro lado, se encontra poucas ou nenhuma cadeia N-ligada (Cyster *et al.*, 1991). Este domínio apresenta ainda alta carga negativa, devido principalmente à presença de unidades terminais de ácido siálico e de grupamentos SO_4^- (Giordanengo *et al.*, 1995) na maioria das cadeias O-oligossacarídicas (Carlsson *et al.*, 1986; Fukuda & Carlsson, 1986).

A presença de várias cadeias sialiloligossacarídicas contribui para que o domínio extracelular apresente uma conformação estendida, não enovelada. Análises por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que o CD43 é mais extenso do que a maioria das demais glicoproteínas de superfície celular, projetando-se cerca de 45 nm a partir da bicamada lipídica (Cyster *et al.*, 1991).

Estudos utilizando anticorpos monoclonais permitiram a identificação de duas glicoformas principais do CD43 na superfície de linfócitos T, uma de 115 kDa (Baecher *et al.*, 1988) e outra de 130 kDa (Jones *et al.*, 1994). A primeira é formada pelo core tetrassacarídico (NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-6)GalNAc-Ser/Thr) reconhecido pelo anticorpo monoclonal S7. A isoforma de 130 kDa é reconhecida pelo anticorpo 1B11 e é formada pelo hexassacarídeo (NeuNAc α 2-3Gal β 1-3(NeuNAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6) GalNAc-Ser/Thr. A isoforma de maior massa molecular é derivada da isoforma de 115kDa, dado principalmente pelo aumento da expressão da enzima N-

acetilglucosaminiltransferase core 2 (Ellies *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1994). A glicofoma de 130 kDa é constitutiva na maioria das células TCD8⁺. Apenas 20% das células TCD4⁺ maduras e imaturas expressam CD43 contendo a glicofoma de massa molecular menor (115 kDa), e conseqüentemente menor expressão da *N*-acetilglucosaminiltransferase que *O*-glicosila o core 2 da leucosialina. No entanto, durante o processo de ativação, a expressão da glicofoma de 130kDa é aumentada significativamente em linfócitos TCD4⁺ (Jones *et al.*, 1994). A figura 2 mostra a biossíntese das glicofomas majoritárias do CD43, as enzimas envolvidas na formação das *O*-glicanas e as alterações durante a ativação de linfócitos.

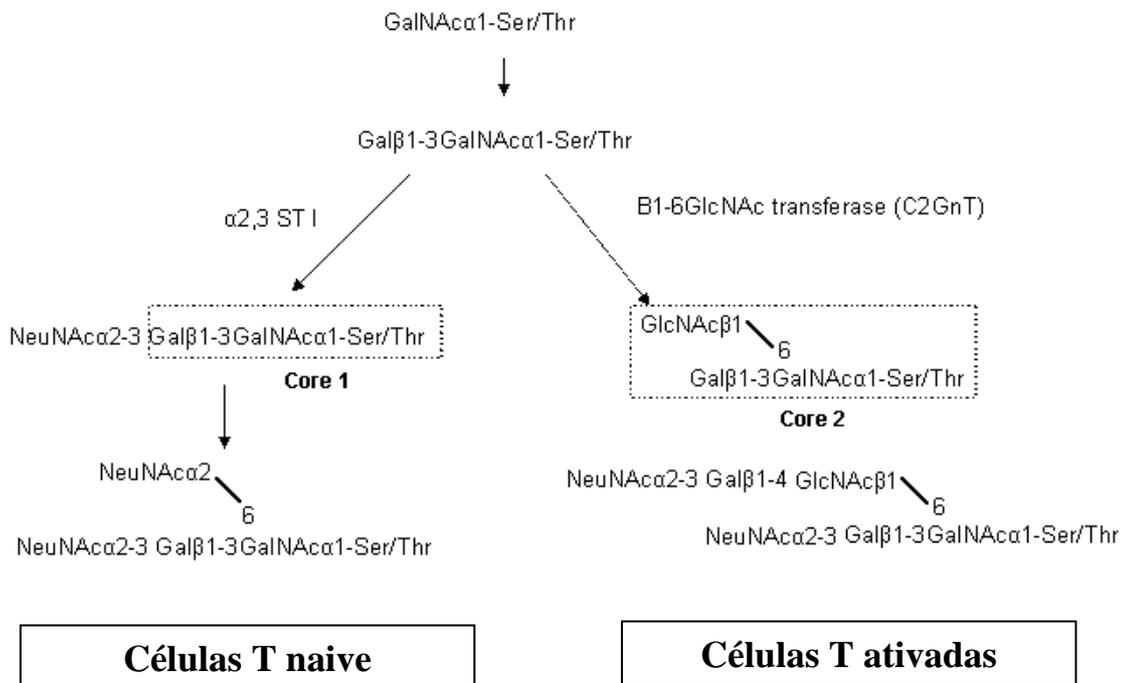


Figura 2. Estrutura e biossíntese de *O*-glicanas do CD43. Em células T naive a glicofoma é de 115kda, apresentando tetrassacarídeos. Em células T ativadas a principal glicofoma encontrada apresenta hexassacarídeos *O*-ligados ramificados, formados pela ação da enzima core 2 β-1,6-*N*-acetilglucosaminiltransferase. Adaptado de (Fukuda & Tsuboi, 1999).

Considerando sua estrutura estendida, as modificações pós-tradução e a grande quantidade de cópias da molécula na superfície celular, é proposto que o CD43 seja uma das moléculas a ter o primeiro contato na interação entre célula-célula; célula-ligante/receptor.

1.10 - O CD43 no contato célula-célula

O primeiro trabalho a avaliar a participação do CD43 na interação entre células foi realizado por Ardman e colaboradores (1992). Nesse trabalho, os autores testaram a interação de células T de sangue periférico, timócitos e células tumorais linfóides com células HeLa (câncer de cólon uterino) transfectadas com o gene do CD43. Os autores observaram que todas as células testadas aderiam menos às HeLa transfectadas se comparadas àquelas que não superexpressavam CD43, sugerindo que o CD43 seja capaz de modular negativamente o contato entre células. Ostberg e colaboradores (1996) demonstraram que o CD43 tem papel importante na indução da resposta humoral induzida pelo contato entre linfócitos T e B. Nesse trabalho, os autores utilizaram camundongos transgênicos onde o CD43 era expresso constitutivamente em linfócitos B durante todos os estágios do desenvolvimento. Foi observado que esses animais apresentavam deficiência na produção de imunoglobulinas bem como no número de células antígeno específicas em modelo utilizando ovalbumina, onde a ativação da célula B depende do contato com a célula T. Além disso, os autores demonstraram que quando estimuladas com LPS, as células do camundongo transgênico apresentavam perfil de resposta semelhante ao camundongo selvagem. Esses resultados em conjunto sugerem que o CD43 expresso constitutivamente em células B tem papel inibitório na interação célula-célula (Ostberg *et al.*, 1996).

Corroborando com os dados descritos acima, Manjunath e colaboradores (1993) propuseram que o CD43 inibe a adesão entre células. A ausência da sialoglicoproteína aumentou a interação homotípica de linfócitos T bem como a interação receptor-ligante em diferentes linhagens de células, sugerindo que a expressão do CD43 funciona como uma barreira, dificultando o alinhamento entre as membranas de duas ou mais células próximas. Os autores sugerem, ainda, que o efeito de repulsão seja devido à carga negativa de ácidos siálicos nas O-glicanas ligadas à proteína (Manjunath *et al.*, 1993). Utilizando camundongos deficientes para CD43, (Manjunath *et al.*, 1995) demonstraram que células T desses animais são hiperproliferativas quando expostas a estímulos antigênicos e que os linfócitos TCD8⁺ apresentam maior atividade citotóxica em modelo de infecção com o vírus vaccinia, sugerindo que

o CD43 também seja uma molécula capaz de regular negativamente a ativação de células T (Manjunath *et al.*, 1995).

Foi demonstrado que o domínio citosólico da leucosialina interage com proteínas adaptadoras de citoesqueleto pertencentes à família ERM (ezrina-radixina-moesina) fazendo com que o CD43 seja movido da fenda sináptica durante a interação entre células (Allenspach *et al.*, 2001; Delon *et al.*, 2001; Roumier *et al.*, 2001; Takai *et al.*, 2008). De fato, o CD43 está localizado em um pólo distal na superfície de células T ativadas (Revy *et al.*, 2001; Savage *et al.*, 2002). Tal evento ocorre, por exemplo, durante a interação de linfócitos T com células apresentadoras de antígenos, onde a inibição da segregação do CD43 na superfície leva à diminuição na produção de IL-2 e IFN- γ (Sperling *et al.*, 1998) sugerindo, portanto, que a inibição promovida pela barreira física pode ser revertida através da remoção local da sialoglicoproteína.

Paradoxalmente, há autores que propõem que o CD43 participa ativamente na adesão entre células. Foi demonstrado, que anticorpos anti-CD43 inibem a adesão de linfócitos T às células endoteliais nos linfonodos e nas placas de Peyer, impedindo o extravasamento das células T do sangue para os órgãos linfóides secundários (McCevey *et al.*, 1997).

Sanchez-Mateos e colaboradores (1995) demonstraram que a interação do CD43 com um agonista pode desencadear sinalização, levando a indução de outros mecanismos convencionais de adesão. Anticorpos anti-CD43 aumentam a adesão de linfócitos T à fibronectina, *vascular adhesion molecule* (VCAM-1), e *intercelular adhesion molecule* ICAM-1 (Sanchez-Mateos *et al.*, 1995) e também a interação homotípica, dependente de CD18, entre leucócitos (Axelsson *et al.*, 1988; Nong *et al.*, 1989; Kuijpers *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994).

1.11 – Sinalização via CD43

Quando a célula T encontra uma célula apresentadora de antígeno que expõe um peptídeo específico, ela torna-se uma célula efetora (Santana & Rosenstein, 2003). A geração desse tipo de resposta depende de dois sinais independentes (Nakajima & Azuma, 1997). O primeiro sinal é dado pela interação entre o receptor da célula T (TCR) e o complexo peptídeo-MHC

presente na célula apresentadora de antígeno. O sinal específico é acompanhado por um segundo sinal co-estimulatório, citocinas ou co-receptores que irá determinar o perfil de citocinas produzidas pelas células efectoras (Santana & Esquivel-Guadarrama, 2006).

Há três subpopulações majoritárias de células efectoras. As células do tipo 1 (Th1) secretam IFN γ , IL-2 e fator de necrose tumoral *alfa* (TNF- α) e medeiam a resposta imune celular através da ativação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos (Szabo *et al.*, 2003; Berenson *et al.*, 2004). Células T do tipo 2 (Th2) secretam IL-4, IL-5 e IL-13, induzem a mudança de isotipo de imunoglobulinas para IgG1 e IgE promovendo a degranulação dos mastócitos para criar uma barreira imunológica (Mowen & Glimcher, 2004). A terceira subpopulação, Th17, secreta IL-17A e F, G-CSF, e as quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11; esses mediadores promovem a diferenciação de neutrófilos e são importantes no combate a bactérias extracelulares (Kawaguchi *et al.*, 2004). Células naive também podem se diferenciar em células T regulatórias (Treg) - produtoras de (TGF- β) , em Treg - produtoras de IL-10 - ou em iTreg que são produtoras de IL-10 e TGF- β (Mills , 2004). A Fig.3 ilustra as subpopulações de células TCD4⁺.

Foi demonstrado por Sperling e colaboradores em 1995 que a sinalização via CD43 pode atuar em sinergia com TCR induzindo a proliferação de células T, mesmo na ausência de outro sinal co-estimulatório. Além disso, foi demonstrado (Barat & Tremblay, 2002) que a sinalização via CD43 aumenta a atividade transcricional do HIV-1 e a produção de partículas virais que acontece após o engajamento entre TCR e CD3, sugerindo que a leucosialina pode ser vista como uma molécula de superfície co-estimulatória capaz de modular a produção de partículas de HIV em linfócitos T.

Santana e colaboradores (2000) demonstraram que a sinalização via CD43 foi suficiente para induzir a expressão dos genes para IL-2, CD69, e CD40L em linfócitos T humanos, mesmo na ausência de um segundo sinal. A sinalização via CD43 resultou na indução da ligação de *nuclear factor of activated T cells* (NF-AT) ao DNA e ainda na ativação de *nuclear factor kapa B* (NF-kB) e *activator protein* (AP-1) provavelmente via proteína cinase C, uma vez que o tratamento com ciclosporina A e staurosporina inibiu parcialmente a indução dessas respostas. Esses resultados demonstram que a sinalização via

CD43 pode ser importante na regulação da expressão gênica e em funções celulares (Santana *et al.*, 2000). Mais recentemente foi descrito que o CD43 está diretamente envolvido na indução da resposta Th1 de linfócitos humanos.

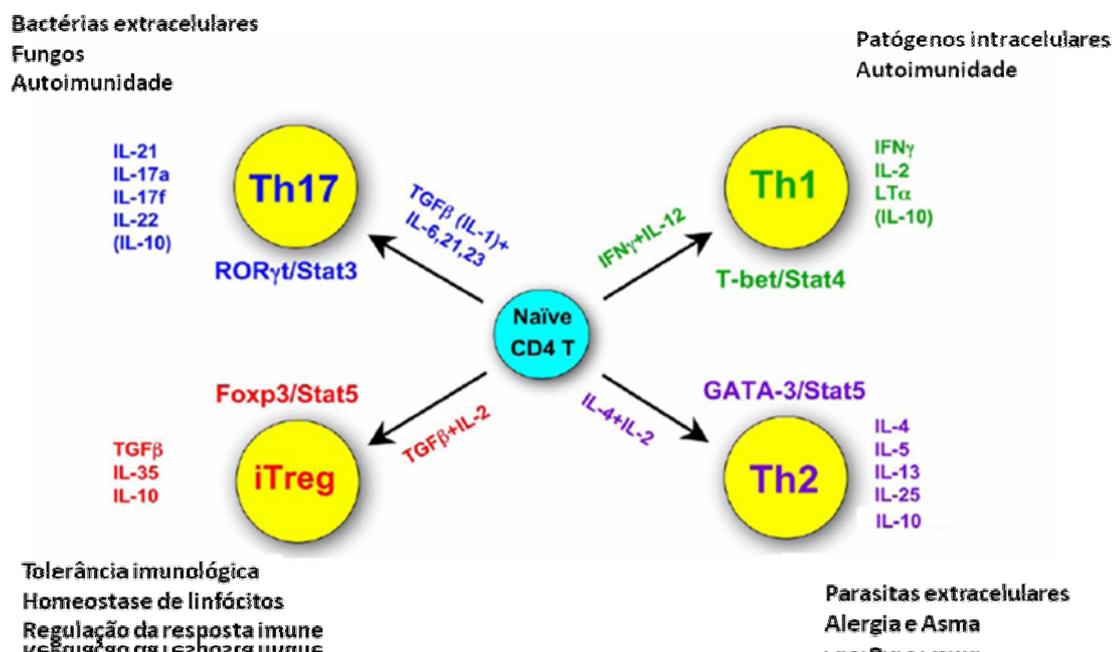


Figura 3. Resumo das subpopulações de células TCD4⁺. Funções, citocinas produzidas, fatores de transcrição característicos e citocinas críticas para determinação do fenótipo subpopulações de células TCD4⁺. Adaptado de Zhu & Paul 2008.

A combinação de sinais entre o TCR e o CD43 foi capaz de aumentar a transcrição do gene para T-Bet e inibir a transcrição de GATA-3. Além disso, há um aumento na expressão dos receptores de IL-12 e IFN- γ , levando a um comprometimento com a resposta Th1 (Ramirez-Pliego *et al.*, 2007). Corroborando com esses dados, Cannon e colaboradores (2008) mostraram que camundongos deficientes para CD43 apresentam uma tendência à resposta Th2. A translocação de GATA-3 para o núcleo é aumentada e o influxo intracelular de Ca⁺⁺ é menor em células T provenientes desses animais.

Em estudos *in vivo*, os camundongos deficientes em CD43 apresentaram aumento na produção das citocinas Th₂ IL-4 e IL-13 frente ao estímulo com peptídeo de ovalbumina, fatores característicos da resposta do

tipo Th2 (Cannon et al., 2008). Juntos, esses resultados sugerem que o CD43 pode regular a diferenciação das subpopulações de linfócitos T.

Além de ser relevante na ativação e diferenciação de células TCD4⁺, Ford & Evavold (2006) já haviam demonstrado a importância da molécula na montagem da resposta mediada por células TCD8⁺. Em modelo de encefalite experimental autoimune, utilizando o peptídeo MOG37-50 como antígeno, camundongos deficientes em CD43 apresentaram uma frequência menor de células TCD8⁺, sendo essas células menos encefalitogênicas após a imunização com o peptídeo. Além disso, os animais mostraram deficiência na fosforilação de ERK em resposta ao antígeno. Esse trabalho caracterizou a importância do CD43 na ativação e expansão de células TCD8⁺ autorreativas.

O CD43 também está envolvido na indução da apoptose, fenômeno essencial para o controle homeostático de linfócitos. Por exemplo, alterações na regulação de processos de apoptose podem levar a câncer e doenças autoimunes. Há processos ativos de indução de morte por apoptose através de moléculas que se ligam a receptores de morte tais como, Fas e receptor de TNF (Lenardo *et al.*, 1999). O “cross-linking” de Fas por ligante de Fas (FasL) ou por agonistas leva à oligomerização do domínio extracelular do Fas e à clivagem de caspases intracelulares (Medema *et al.*, 1997; Muzio, 1998), induzindo apoptose. O engajamento do CD43 leva a apoptose de linfócitos T e de progenitores celulares hematopoiéticos (Bazil *et al.*, 1995; Cermak *et al.*, 2002). Priatel e colaboradores (2000) demonstraram que anticorpos 1B11, que reagem contra a glicofoma de 130 kDa do CD43, são capazes de induzir agregação do CD43 em células TCD8⁺ ativadas e levar à morte por apoptose em um mecanismo dependente de caspases.

Kim e colaboradores (2006) propuseram que o CD43 aumenta a agregação de Fas em células Jurkat, sugerindo a participação do CD43 em um mecanismo clássico de indução de apoptose. Porém, altos níveis da molécula na superfície celular inibe a apoptose induzida pelo engajamento de TCR e CD3 (He & Bevan, 1999). Estudos recentes mostraram que o CD43 está envolvido na ligação e na ingestão de *M. tuberculosis* pelos macrófagos (Fratuzzi *et al.*, 2000; Randhawa *et al.*, 2005). Os autores mostraram que macrófagos CD43 deficientes infectados produziam menos TNF- α , IL-12 e IL-6, morriam menos por apoptose e mais por necrose, propondo que o CD43 é

importante na resposta inflamatória contra a micobactéria (Randhawa, 2008). Mais recentemente, Khan e colaboradores (2008) propuseram que a glicosilação anormal das cadeias O-glicanas do CD43 observada em pacientes com a síndrome de Wiskott-Aldrich pode contribuir para as desordens auto-imunes que ocorrem nesta doença. Em pacientes com Wiskott-Aldrich, há uma diminuição da expressão da enzima β 1-6GlcNAc transferase, que forma o core 2 na cadeia sacarídica do CD43 e os autores propõem que tal alteração compromete o processo de seleção tímica permitindo que células auto-reativas alcancem a periferia provocando as desordens auto-imunes de cunho inflamatório como eczema, vasculite e anemia hemolítica.

1.12 – Mecanismos de recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios

O recrutamento de leucócitos induzido por infecções ou danos teciduais é um fenômeno imunológico que permite que as células deixem o compartimento intravascular e transmigrem para os tecidos (Butcher, 1991). Esse processo tem início com o engajamento de leucócitos livres à parede dos vasos durante o fluxo sanguíneo que é extremamente dependente de uma família de glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio, chamadas de selectinas (Kansas, 1996). O engajamento das células circulantes ao endotélio é um evento dinâmico, onde as células aderidas rolam à uma velocidade 100 a 1000 vezes menor do que aquelas que estão sob as condições normais do fluxo, permitindo a subsequente adesão e transmigração dos leucócitos através da parede endotelial (Marshall & Haskard, 2003; Yago *et al.*, 2004). Os leucócitos atravessam a camada endotelial através de interações entre PECAM-1 (CD31) que é expresso tanto nos leucócitos como nas membranas das células endoteliais, migrando de acordo com um gradiente quimiotático formado por substâncias liberadas no sítio da injúria (revisto por Muller & Lipp, 2003). A figura 4 mostra um esquema do processo de recrutamento de leucócitos.

Três tipos de selectinas são descritas e nomeadas de acordo com a célula onde elas foram originalmente identificadas: P-selectina em plaquetas, L-

selectina em leucócitos e E-selectina em endotélio. Todos os três tipos apresentam estrutura semelhante, contendo um domínio N-terminal do tipo lectina, um domínio do tipo fator de crescimento epidermal, número variado de sequências consenso, um único domínio transmembrana e uma região citoplasmática curta (revisito por Kelly *et al.*, 2007).

P-selectinas (CD62P) são constitutivamente expressas e estocadas em grânulos secretórios conhecidos como grânulos α (nas plaquetas) ou corpos de Weibel-Palade (no endotélio). Quando o endotélio é estimulado por fatores inflamatórios como trombinas, leucotrienos, oxidantes, histamina ou LPS, esses grânulos rapidamente fundem-se com a membrana plasmática aumentando a sua expressão na superfície da célula (Geng *et al.*, 1990).

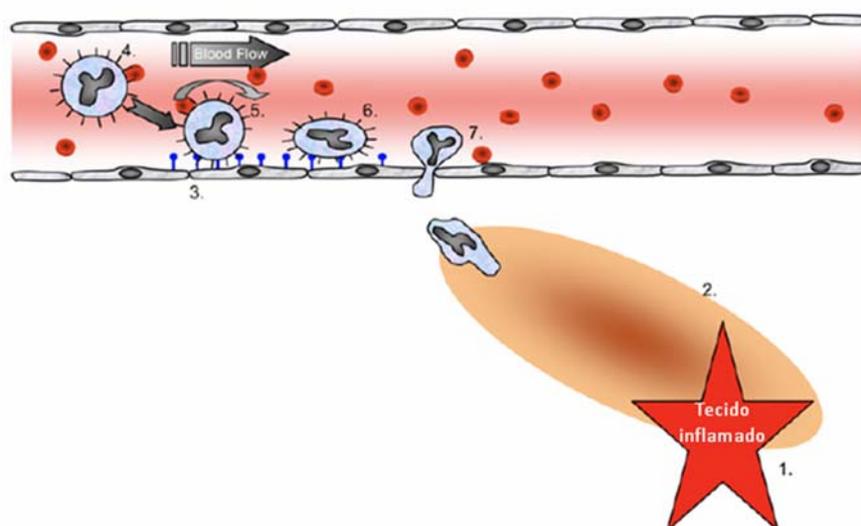


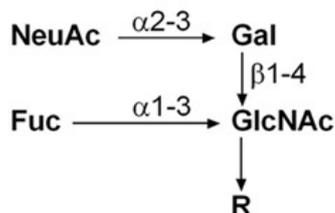
Figura 4. Recrutamento de leucócitos para sítios inflamados. O tecido inflamado (1) libera mediadores químicos (2) que podem ser detectados pelo sistema imune. Em resposta a esses mediadores, as células endoteliais produzem moléculas de adesão (3) e leucócitos em fluxo no sangue (4) interagem, rolam (mediado por selectinas) (5) e aderem (mediado por integrinas) (6). A célula imune deixa o vaso sanguíneo (7) e chega ao tecido. Adaptado de (Kelly *et al.*, 2007).

Adicionalmente, a transcrição de P-selectina em humanos pode ocorrer após a ativação do endotélio por citocinas como IL-4 e IL-13 mas não por TNF- α e IL-1 (Yao *et al.*, 1996; Woltmann *et al.*, 2000). Pelo contrário, em camundongos, a transcrição de P-selectina pode ser ativada por TNF α , IL-1, LPS e IL-4 (Pan *et al.*, 1998). P-selectina está envolvida no recrutamento inicial durante a resposta inflamatória (Mayadas *et al.*, 1993).

E-selectinas (CD62E) têm a expressão e síntese *de novo* estimuladas por mediadores como IL-1, TNF- α e LPS. A expressão pode ocorrer no endotélio em até duas horas após a estimulação (Kansas *et al.*, 1996). Embora sua expressão seja temporalmente mais lenta do que a de P-selectinas, há sobreposição na expressão de ambas as moléculas, contribuindo para aumentar o recrutamento de leucócitos durante o processo inflamatório (Frenette *et al.*, 1996). E-selectina reconhece tanto epítomos sialilados, presentes nas cadeias O-glicanas das mucinas, como epítomos fucosilados presentes em estruturas como o determinante sialil Lewis^x (Lowe, 2002) esquema 1.

A L-selectina (CD62L) foi originalmente descrita como molécula envolvida na migração, permitindo a entrada de leucócitos em órgãos linfóides secundários. São expressas na maioria dos leucócitos e medeiam o rolamento em algumas condições inflamatórias, embora seu papel pareça ser secundário em relação às duas outras selectinas endoteliais (Jung *et al.*, 1999).

Os ligantes das selectinas estão na porção de carboidratos presentes em mucinas. Todas as três selectinas reconhecem o mesmo tetrassacarídeo sialilado, sialil lewis^x cuja estrutura está representada no esquema abaixo:



Esquema 1. Estrutura simplificada do tetrassacarídeo sialilado sialil Lewis.

Entre os ligantes de P-selectina, o melhor caracterizado é a glicoproteína ligante de P-selectina 1 (PSGL-1) (Kansas *et al.*, 1996). O rolamento de leucócitos via P-selectina é quase que completamente dependente de PSGL-1, no entanto, outros autores apontam a PSGL-1 também como ligante para E-selectina (Zanardo *et al.*, 2004).

Entre os ligantes mais bem estudados para L-selectina estão: molécula adressina de adesão celular de mucosa (MAdCAM – 1) ; CD34 e glicoproteína sulfatada Sgp200 (revisto por Rosen, 2004). Além destes, PSGL-1 também já

foi apontado como ligante de L-selectina (Sperandio *et al.*, 2003), porém o mecanismo exato pelo qual PSGL-1 contribui para o rolamento dependente de L-selectina ainda não está caracterizado. Recentemente Shigeta *et al.*, (2008) sugerem a presença de outro ligante de L-selectina mediando o rolamento de leucócitos em camundongos deficientes para PSGL-1.

Entre os principais ligantes de E-selectina estão CD44 (Hidalgo *et al.*, 2007), ligante de E-selectina (ESL-1) (Steegmaier *et al.*, 1995) e o CD43 (Matsumoto *et al.*, 2005; Fuhlbrigge *et al.*, 2006), porém a relevância da ligação da leucosialina com E-selectina para modelos inflamatórios *in vivo* permanece não elucidada. Em 2007 foi demonstrado por Alcaide e colaboradores que a glicofoma de maior massa molecular (130kDa) presente na superfície de células T é a que funciona fisiologicamente como ligante para E-selectina *in vitro* e *in vivo* em modelo de hipersensibilidade tardia. A descrição de E-selectina como ligante para o CD43 acrescenta-se a de outros autores que propunham ICAM-1 como outro possível ligante (Rosenstein *et al.*, 1991).

1.13 – CD43 e inflamação

Vários autores descrevem a importância do CD43 na migração de leucócitos para tecidos inflamatórios. (Ardman *et al.*, 1992; Manjunath *et al.*, 1995; McEvoy *et al.*, 1997; Woodman *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2005 e 2008). Em 2003, Ford e colaboradores demonstraram que camundongos deficientes para CD43 eram menos suscetíveis à encefalite autoimune experimental, uma doença caracterizada pelo intenso influxo inflamatório de leucócitos no cérebro. A ausência do CD43 culminou com uma menor quantidade de linfócitos TCD4⁺ no cérebro, diminuindo a severidade clínica e histopatológica da doença (Ford *et al.*, 2003). Estes dados corroboram dados anteriores que apontam a inibição da migração leucocitária, via CD43, como alvo para doenças de ordem inflamatória Johnson *et al.*, (1999), trataram camundongos com o anticorpo antagonista anti-CD43 clone L11 e observaram que houve inibição da reação inflamatória no pâncreas de camundongos que desenvolvem diabetes insulino-dependente. Adicionalmente, Nonomura e colaboradores (2008) demonstraram que o CD43 também está envolvido na adesão e extravasamento de células durante a leucemia linfoblástica aguda de

precursores de células B (BCP-ALL). De maneira interessante, todas as células BCP-ALL obtidas de humanos são PSGL-1^{neg/low} CD43^{high}. Os autores demonstraram que o silenciamento do CD43 levou a uma forte diminuição das infiltrações periféricas em modelo murino, apontando a manipulação do CD43 como importante alvo neste tipo de leucemia.

Baseado em sua importância no recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios e nas características estruturais da glicoproteína descritas anteriormente na introdução, o CD43 é alvo de muitos estudos em modelos de doenças infecciosas. No entanto, na doença de Chagas, pouco se sabe sobre o envolvimento do CD43 durante o estabelecimento do processo infeccioso e ainda, no recrutamento de leucócitos para os tecidos infectados.

2 – Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o papel da leucosialina CD43 na resposta imune e inflamação durante as fases aguda e crônica da infecção experimental murina pelo *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de resposta de linfócitos T nos camundongos CD43KO infectados;
- Avaliar a parasitemia e a mortalidade dos CD43KO, comparando aos animais selvagens infectados;
- Avaliar o envolvimento do CD43 no recrutamento de leucócitos para o coração;
- Investigar os danos cardíacos causados em camundongos CD43KO e WT infectados durante as fase aguda e crônicas da doença de Chagas;

3 . Materiais e métodos

3.1 - Camundongos

Durante o trabalho, foram utilizados camundongos C57Black6 (B6) deficientes para CD43 e B6 selvagens com idade entre seis e oito semanas. Os animais deficientes foram gentilmente cedidos pelo Dr. Hermann Ziltener da Universidade de British Columbia, Vancouver, Canadá. Os animais foram mantidos no Laboratório de Animais Transgênicos da Fundação BioRio e utilizados segundo as normas do comitê de ética para utilização de animais em pesquisa de laboratório.

3. 2 – Parasitas e infecção

Formas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram mantidas *in vivo* por passagens semanais sucessivas em camundongos B6 com peso acima de 20 gramas. Para experimento, os animais foram sacrificados e o sangue obtido por punção cardíaca. Para ajuste do inóculo, os parasitas foram diluídos em tampão fosfato-salina (PBS) e contados em câmara de Neubauer. Durante os experimentos de fase aguda, cinco camundongos de cada grupo foram infectados com 10^4 parasitas por via intraperitoneal em um volume final de 100 μ L por animal. O experimento de análise da sobrevivência foi feito utilizando como inóculo inicial 10^5 parasitas por camundongo utilizando um n de 10 camundongos por grupo. Já para fase crônica, o inoculo inicial foi de apenas 100 formas tripomastigotas sanguíneas.

3.3 – Parasitemia e mortalidade

Nos experimentos de fase aguda, a contagem do número de parasitas na corrente sanguínea foi realizada do 6º ao 10º dias após a infecção. A mortalidade cumulativa foi acompanhada diariamente por um período de 30 dias. Para os experimentos de fase crônica, o número de parasitas no sangue foi avaliado do 6º ao 14º . Em ambos, a contagem foi realizada pelo método de Pizzi-Brenner. (Saraiva, 2002).

3.4 – Avaliação da lesão no tecido cardíaco

A atividade da enzima Creatina kinase – isotipo cardíaco CK MB – foi mensurada no plasma dos camundongos normais e infectados, como indicativo de lesão tecidual no coração (de Souza, 2000). Os animais foram sacrificados no 15º dia após a infecção e o sangue foi obtido por punção cardíaca. 5µL do plasma sanguíneo de cada animal foram adicionados a 125µL do reagente de detecção fornecido pela Merck Labs. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, comprimento de onda 340nm, a cada minuto durante 7 minutos consecutivos. O aumento da atividade da enzima no plasma dos animais infectados foi aferido comparando-se à leitura obtida no plasma de animais normais.

3.5 – Histologia

Os corações de 5 camundongos de cada grupo foram seccionados ao meio, embebidos em tampão de congelamento tissular (Tissue Tek) e conservados a - 80°C. Com auxílio de um criostato, foram feitos cortes de 5µm que foram capturados em lâminas pré-filmadas com resina de Poly-L-Lisina. Foram feitas 20 lâminas de cada animal do grupo. Em seguida, as lâminas foram fixadas em formol tamponado pH 7.2, durante 30 min à temperatura ambiente e depois congeladas. A coloração por hematoxilina e eosina (HE) permitiu a contagem de células inflamatórias nos infiltrados em 100 campos aleatórios, aumentos de 100 e 400 vezes.

3.6 – PCR em Tempo Real

A quantificação do DNA de *T. cruzi* no tecido cardíaco de camundongos B6 selvagens e CD43 deficientes 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:

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

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 minicírculos 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 (CCAAGCAGCGGATAGTTTCAG) (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.

3.7 – Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

A indução e quantificação da atividade citotóxica *in vitro* foi realizada utilizando células T CD8⁺ específicas para o peptídeo PA8 (VNHRFTLV) da proteína ASP-2 de amastigota. Este peptídeo foi gentilmente cedido pelo professor Maurício Martins Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As células T totais foram purificadas a partir de esplenócitos totais de camundongos C57Black6 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 (Julius *et al.*, 1973). Esplenócitos totais de camundongos não infectados foram utilizados 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 diferentes concentrações (12,5 ; 2,5 e 1,25 µM) do peptídeo VNHRFTLV 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 x 10⁵ células por poço (1 x 10⁵ CFSE^{low}/1 x 10⁵ CFSE^{high}) durante 24 horas na presença de células T totais obtidas de camundongos WT ou CD43KO infectados. Após 20 h a 37° C, 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 = $1 - (\%CFSE_{high} \text{ infectado} / \%CFSE_{low} \text{ infectado}) / (\%CFSE_{high} \text{ normal} / \%CFSE_{low} \text{ normal}) \times 100$.

3.8 – Elisa para detecção de IL-4 e IFN- γ em culturas de células T esplênicas

Os camundongos foram sacrificados no 15º dia após infecção e o baço dos animais foi processado para obtenção de linfócitos T (Freire-de-Lima *et al.*, 2000). As células foram re-estimuladas *in vitro* por 48 horas na presença ou ausência de anti-CD3 a 10%. 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 4º 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 37º 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 re-estimuladas como descrito acima recuperadas de camundongos B6 WT infectados ou não e CD43KO infectados ou não. As placas foram cobertas e incubadas *overnight* a 4º C. Após lavar as placas 4 vezes com PBS/ TWEEN, 100 μ l (4 μ g/ mL), os anticorpos de detecção biotinilados (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 μ l de estreptoavidina-fosfatase alcalina (1 μ g/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 μ l 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.

3.9 – Marcação de linfócitos T para citocina intracelular

Células T totais esplênicas de camundongos infectados foram obtidas como descrito previamente (Julius *et al.*, 1973), re-estimuladas *in vitro* por 48 horas a 37°C na presença ou ausência de anti-CD3 a 10% em volume final de 0,5mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. O sobrenadante dos poços foi recolhido para dosagem de IL-4 e IFN- γ . Os poços foram recobertos com mais 0,5mL de meio RPMI e re-estimuladas com PMA (Sigma) a uma concentração de 10ng/mL por 1 hora a 37°C. Para inibir a secreção das citocinas, foi adicionado aos poços 10 μ g/mL de Brefeldina A (Sigma) por 3 horas a 37°C. As células foram coletadas, lavadas 2 vezes em tampão salina fosfato (PBS) e marcadas superficialmente com anticorpos anti-CD4-FITC e anti-CD8-PE (BD Pharmigem) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período as células foram lavadas 2 vezes em tampão de FACS (PBS 1x, 0,02% azida de sódio + 3% de soro fetal bovino) e fixadas com paraformaldeído 2% a 4°C durante 20 minutos. Em seqüência, as células foram permeabilizadas em tampão PBS saponina 0,5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. As células que foram marcadas superficialmente para CD4 foram incubadas com anticorpo anti-IL4-PE e as que foram marcadas superficialmente para CD8 foram incubadas com anticorpo anti-IFN γ -FITC. As células positivas para CD4/IL-4 e CD8/IFN γ foram adquiridas por citometria de fluxo utilizando o FACScalibur (Becton e Dieckson) e analisadas com o software WinMDi versão # 2,8.

3.10 – Obtenção de leucócitos infiltrantes no tecido cardíaco

Os corações de camundongos infectados ou não foram removidos no 15º dia após a infecção. Os órgãos foram triturados e lavados 5 vezes em PBS a 4°C para evitar possível presença de leucócitos sanguíneos. Os órgãos triturados foram submetidos a 4 ciclos de digestão com colagenase IV 0,2% (Sigma) a 37°C durante 15 minutos sob agitação branda. As células obtidas foram lavadas 3 vezes em PBS 1X a 4°C e marcadas com anticorpos anti-CD4-FITC e anti-CD8-PE. Foram adquiridos um total de vinte mil eventos dentro da região específica para leucócitos e o percentual de leucócitos totais infiltrantes bem

como o percentual de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no tecido cardíaco foi aferido por citometria de fluxo utilizando o FACScalibur (Becton e Dieckson) e analisado com auxílio do software WinMDi versão # 2,8.

3.11 – Tratamento de animais selvagens e CD43KO com a TSi para avaliação do dano cardíaco.

Durante o experimento foram utilizados 5 animais por grupo. A TSi foi administrada na concentração de 30 µg/dose em um volume final de 100µL/dose por via endovenosa 1 h antes da infecção, assim como no 1º e 2º dias após a infecção. Os animais foram sacrificados no 15º dia após a infecção, o sangue foi obtido por punção cardíaca e o ensaio da atividade creatina quinase foi realizado como descrito no item 3.4.

3.12 – Avaliação do peso seco dos corações obtidos de animais cronicamente infectados

Os corações removidos foram lavados em PBS 1x para retirar o excesso de sangue e o peso seco dos órgãos foi aferido em balança de precisão (A&D company) ao décimo de miligrama.

3.13 – Coloração para avaliação de deposição de fibras de colágeno (Picrosirius);

Os corações de 5 animais foram removidos dos animais cronicamente infectados no nonagésimo dia após a infecção. Os órgãos foram congelados em tampão para congelamento Tissular (Tissue TEK) e com auxílio de um criostato foram feitos cortes na espessura de 10µM. Foram feitas 20 lâminas de cada animal. As lâminas contendo os cortes foram fixadas em formol tamponado pH 7,2 e coradas em solução de picrosirius. A contagem da deposição de colágeno no tecido cardíaco foi realizada com auxílio do programa Image ProPlus 4.0.

3.14 – Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste T não paramétrico (Mann Withney) com intervalo de confiança de 95%.

4 – Resultados

4.1 – Camundongos CD43KO infectados apresentam um perfil de resposta do tipo Th_2 .

Uma vez demonstrado que o CD43 está diretamente envolvido na polarização das células $TCD4^+$ para uma resposta do tipo Th_2 (Ramirez-Pliego *et al.*, 2007), inicialmente avaliamos o perfil de resposta mediada por linfócitos T auxiliares em camundongos CD43KO infectados com o *T. cruzi*, cepa Y. Através dos experimentos de imunoenensaio (ELISA) (Fig. 5), foi possível observar que os camundongos CD43KO infectados apresentaram, no sobrenadante de cultura de linfócitos T esplênicos re-estimulados *in vitro* com α -CD3, um aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de IL-4 se comparados aos animais selvagens infectados (Fig. 5a). Corroborando com estes resultados, a marcação intracelular para citocinas mostrou um aumento de aproximadamente 3 vezes no percentual de células $TCD4^+$ produtoras de IL-4 no baço de camundongos CD43KO (Fig 5b). Não foi observada diferença significativa nos níveis de IFN- γ secretados no sobrenadante da cultura (Fig. 5c) nem no percentual de células $TCD8^+$ produtoras de IFN- γ na citometria de fluxo (Fig. 5d). Adicionalmente, não observamos diferença no percentual de células T não $CD8^+$ (possivelmente $CD4^+$) produtoras de IFN- γ (dados não mostrados).

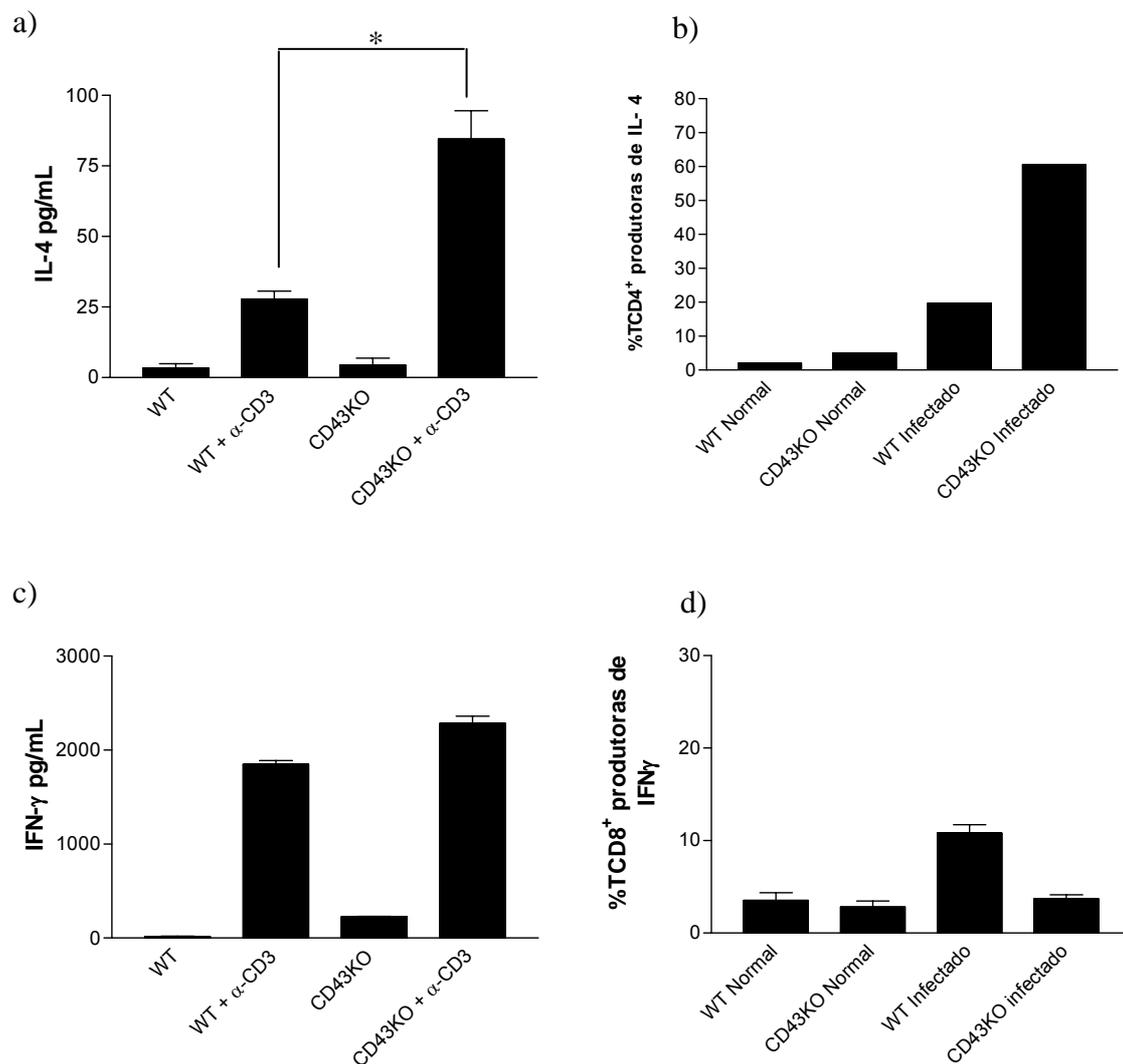


Figura 5. Análise do perfil de resposta T auxiliar em camundongos CD43KO e selvagens infectados com *T. cruzi*. Os animais infectados foram sacrificados no 15º dia após a infecção e a secreção de citocinas (IL-4 e IFN-γ) por células T esplênicas foi acessada por ELISA (a e c) (*, $p < 0.05$); As mesmas células foram incubadas com brefeldina A e marcadas superficialmente com α-CD4(b) e α-CD8(d) e intracelularmente com α-IL-4(b) e α-IFNγ(d) para análise por citometria de fluxo. O gráfico da letra (b) é representativo do “pool” de células obtidas de 6 animais diferentes por grupo. O gráfico (d) representa também o “pool” de células obtidas de 6 animais porém plaqueadas em triplicata.

4.2 – Influência do CD43 na infecção pelo *T. cruzi*

Após observarmos que os camundongos CD43KO infectados pelo *T. cruzi* apresentavam uma tendência de resposta Th₂, avaliamos se este fenômeno poderia ter efeito na parasitemia. Utilizando o método de Pizzi-Brenner (Saraiva *et al.*, 2002), verificamos, de maneira intrigante, que os animais deficientes em CD43 não apresentaram diferença no número de tripomastigotas sanguíneos quando comparados aos animais selvagens (Fig.6).

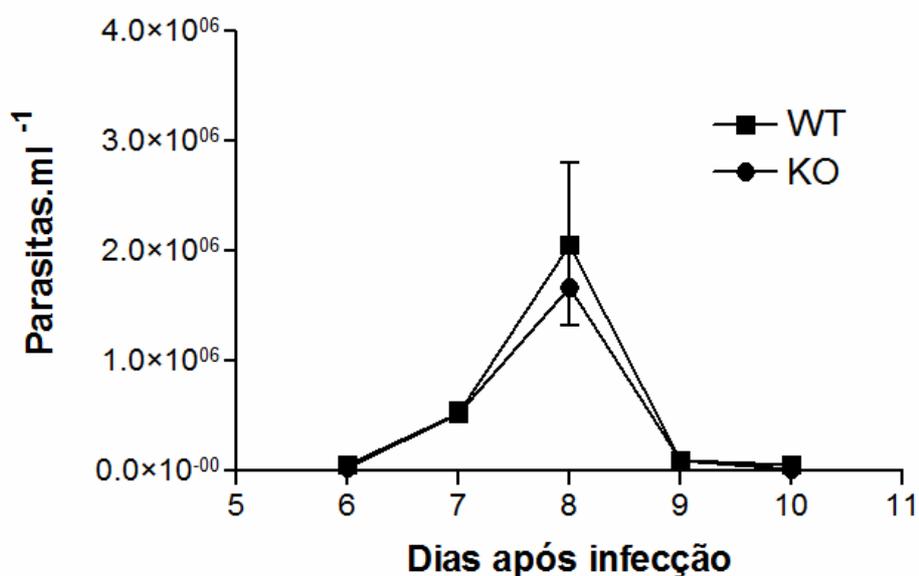


Figura 6. Parasitemia em camundongos selvagens e CD43KO. Os animais selvagens (■) e CD43KO (●) foram infectados com 10⁴ tripomastigotas da cepa Y e o número de parasitas no sangue avaliado do 6º ao 10º dias após a infecção. n = 6

4.3 – Ausência do CD43 favorece a atividade citotóxica mediada por linfócitos.

A observação de que os animais CD43KO não apresentam diferença na parasitemia mesmo desenvolvendo uma resposta Th₂, poderia ser explicada, pelo menos em parte, pelo aumento da atividade citotóxica dos linfócitos esplênicos que não apresentam CD43, como demonstrado anteriormente por Manjunath *et al.*, (1995). Baseado nesses dados, avaliamos a atividade citotóxica de linfócitos T totais esplênicos obtidos de camundongos selvagens e CD43KO com 14 dias de infecção, contra células alvo pulsadas com diferentes concentrações do peptídeo sintético (VNHRFTLV), imunodominante durante a infecção (Tzelepis *et al.*, 2008). O efeito citotóxico *in vitro* foi determinado por citometria de fluxo, como descrito no item 3.7 dos materiais e métodos, pelo desaparecimento da população alvo incubada com o peptídeo VNHRFTLV. Observamos que as células obtidas dos animais deficientes em CD43, quando expostas a menores concentrações do peptídeo, são mais efetas do que as dos animais selvagens (Fig. 7). Linfócitos T totais esplênicos de camundongos não infectados foram utilizadas como controle negativo.

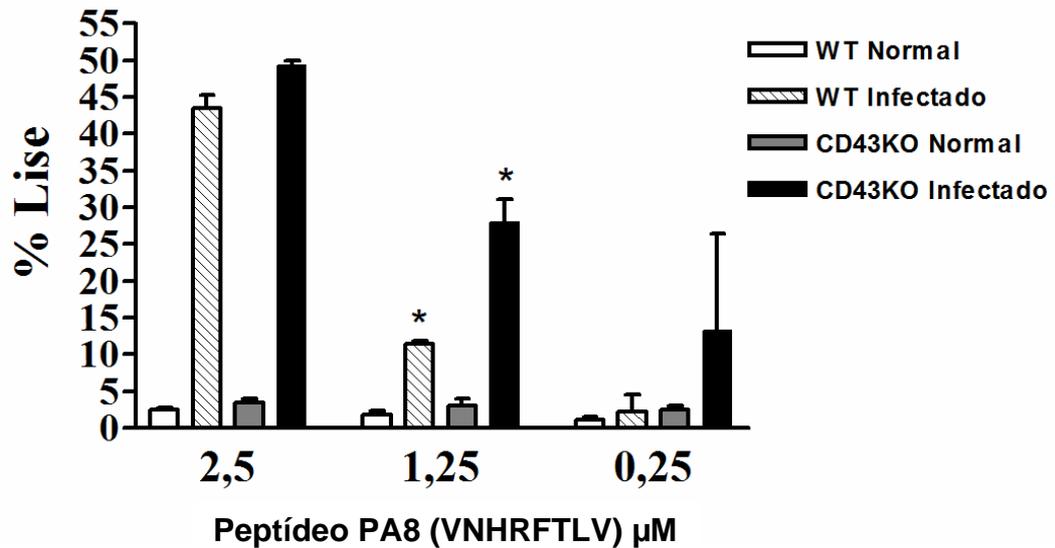


Figura 7. Linfócitos esplênicos deficientes em CD43 apresentam maior atividade citotóxica. Camundongos selvagens (barras riscadas) e CD43KO (barras pretas) foram infectados com *T. cruzi* e no 14º dpi, as células T esplênicas foram purificadas em coluna de Nylon. Células T esplênicas de camundongos normais (barras brancas e barras cinzas) foram utilizadas como controle. Esplenócitos totais de camundongos normais foram utilizados como células estimuladoras e marcadas com 1,0 ou 10 μM do corante vital CFSE. A população marcada com 10 μM tornou-se população alvo após incubação com o peptídeo sintético. A resposta antígeno específica foi monitorada por citometria de fluxo após 20 horas de incubação, pelo desaparecimento da população alvo (10 μM CFSE + peptídeo). O gráfico mostra percentual de lise das células alvo nas diferentes concentrações de peptídeo utilizadas. As células foram adquiridas em FACScalibur (Becton e Dickson) e as análises feitas em regiões morfológicas específicas para leucócitos e células alvo marcadas com CFSE. (*, $p < 0.05$).

4.4 – A carga parasitária é menor no tecido cardíaco de camundongos CD43KO.

Considerando-se que os linfócitos deficientes em CD43 apresentam maior atividade citolítica, sendo esta atividade importante para o controle da proliferação do parasita nos tecidos (revisto por Tarleton, 2004), é plausível propor que a carga parasitária nos tecidos alvo durante a infecção pelo *T. cruzi* esteja alterada nos camundongos CD43KO. Para testar essa hipótese, nós realizamos, pela técnica de PCR em tempo real, a quantificação da concentração de DNA do parasita no tecido cardíaco dos camundongos infectados. Utilizando iniciadores universais para o DNA do parasita, foi possível observar que, no coração dos camundongos CD43KO, a concentração de DNA do *T. cruzi* é menor do que no coração dos camundongos selvagens (Fig. 8).

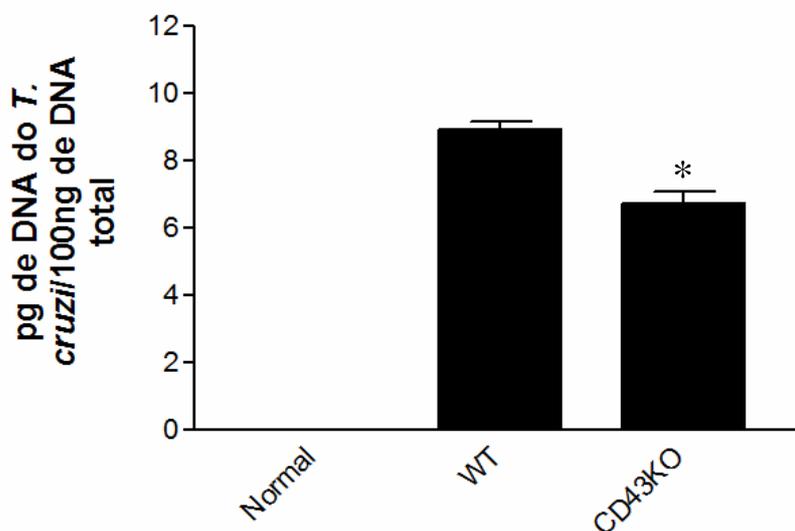


Figura 8. Quantificação da carga parasitária no tecido cardíaco. Os corações dos camundongos infectados foram removidos no 15º dpi e submetidos à digestão por lise alcalina para obtenção do DNA total dos tecidos. (* $p < 0,05$). Gráfico representativo de dois experimentos independentes. $n = 3$

4.5 – Camundongos CD43KO são mais resistentes à infecção pelo *T. cruzi*.

Nós observamos que apesar de não haver diferença na parasitemia, a carga parasitária tecidual nos camundongos CD43KO foi menor. A próxima etapa foi verificar se ausência do CD43 tornaria ou não o animal mais resistente à infecção aguda. Utilizando inóculo letal de 10^5 tripomastigotas sanguíneos, observamos que na ausência do CD43, os animais tornaram-se mais resistentes à infecção. Todos os animais selvagens sucumbiram à infecção até o 13º dia, enquanto que os CD43KO apresentaram sobrevida prolongada (Fig. 9).

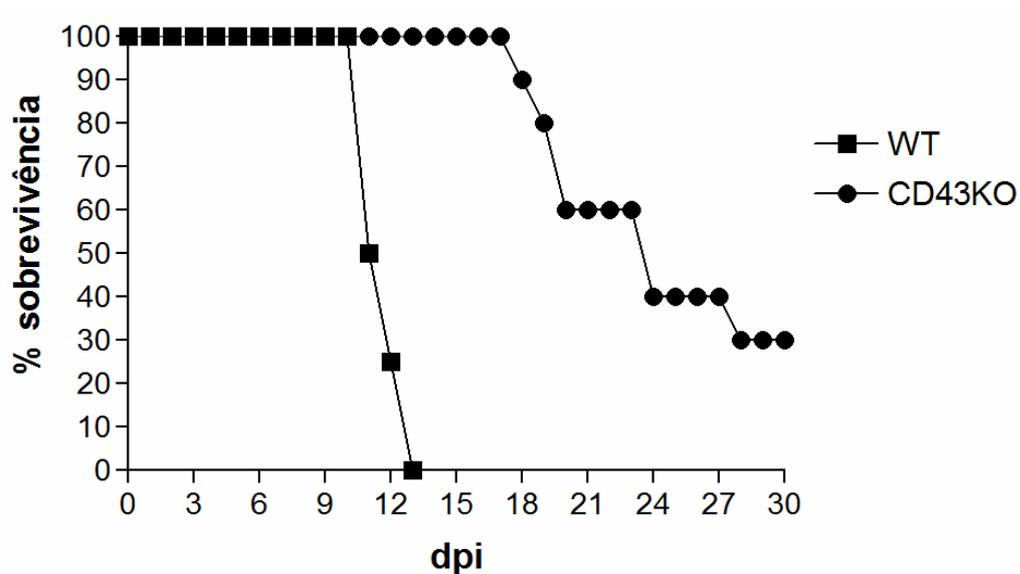


Figura 9. Ausência do CD43 torna os camundongos mais resistentes à infecção pelo *T. cruzi*. 10 camundongos selvagens e 10 CD43KO foram infectados com 10^5 tripomastigotas sanguíneos por via intraperitoneal e a sobrevida foi acompanhada por um período de trinta dias.

4.6 – Camundongos CD43KO apresentam redução no percentual de leucócitos infiltrantes no tecido cardíaco.

Na doença de Chagas murina, além do parasitismo tecidual, a miocardite causada pela resposta inflamatória também pode levar o animal à morte. Dados anteriores (Matsumoto *et al.*, 2005 e 2008) apontam o CD43 como ligante para E-selectina na etapa inicial do recrutamento de leucócitos durante os processos inflamatórios. No intuito de avaliar a participação do CD43 na migração de leucócitos e, mais especificamente, na migração de linfócitos T para o coração, analisamos o perfil do infiltrado inflamatório cardíaco por citometria de fluxo (Fig. 10) e por histopatologia (Fig. 11). Os leucócitos infiltrantes foram obtidos pela digestão do tecido com colagenase IV e analisados por citometria de fluxo. Quando delimitamos uma região específica de tamanho x granulosidade, ficou evidente que nos animais CD43KO infectados, há uma redução no percentual de leucócitos infiltrantes de 80% (Fig. 10b) se comparados aos animais selvagens (Fig 10a). Corroborando com esses dados, a análise do tecido cardíaco corado por hematoxilina e eosina (H&E) revelou uma redução no número absoluto de leucócitos infiltrantes nos animais CD43KO infectados (Fig. 11b) quando comparados aos camundongos selvagens (Fig. 11a). Juntos, estes dados sugerem fortemente o envolvimento da leucosialina CD43 no recrutamento de células inflamatórias para o coração durante a fase aguda da doença de Chagas.

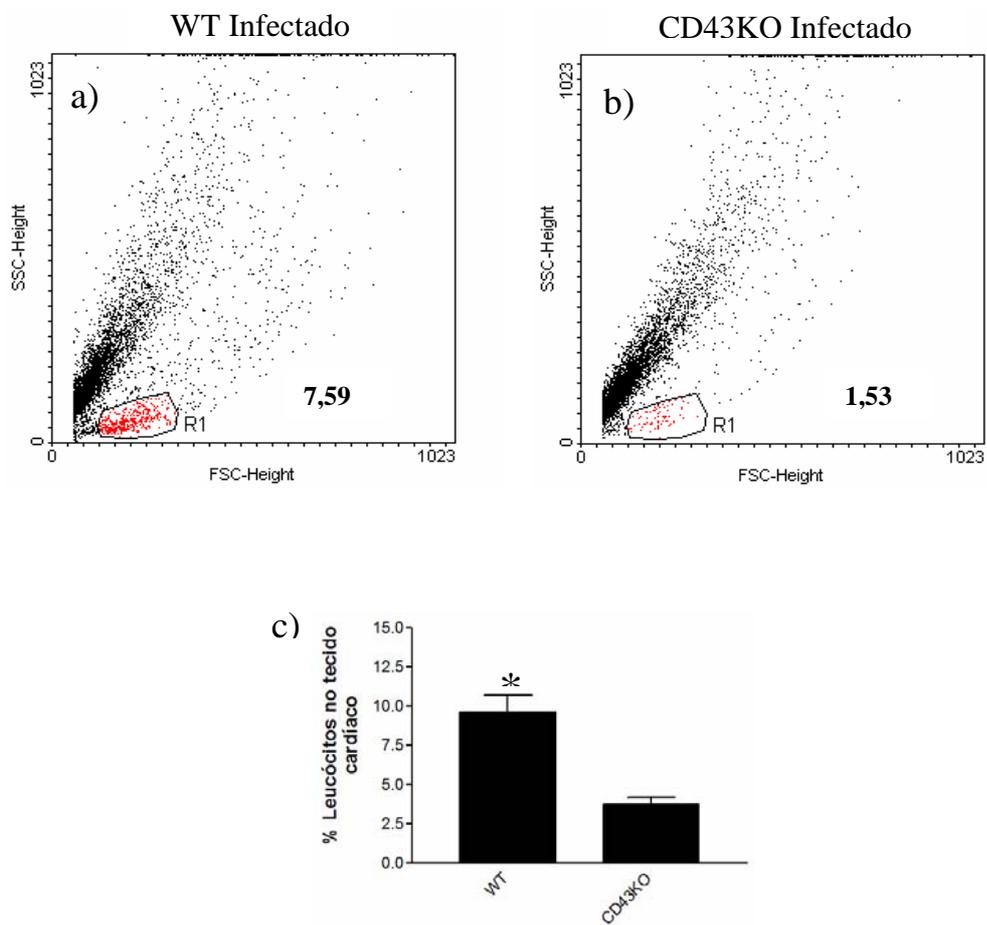
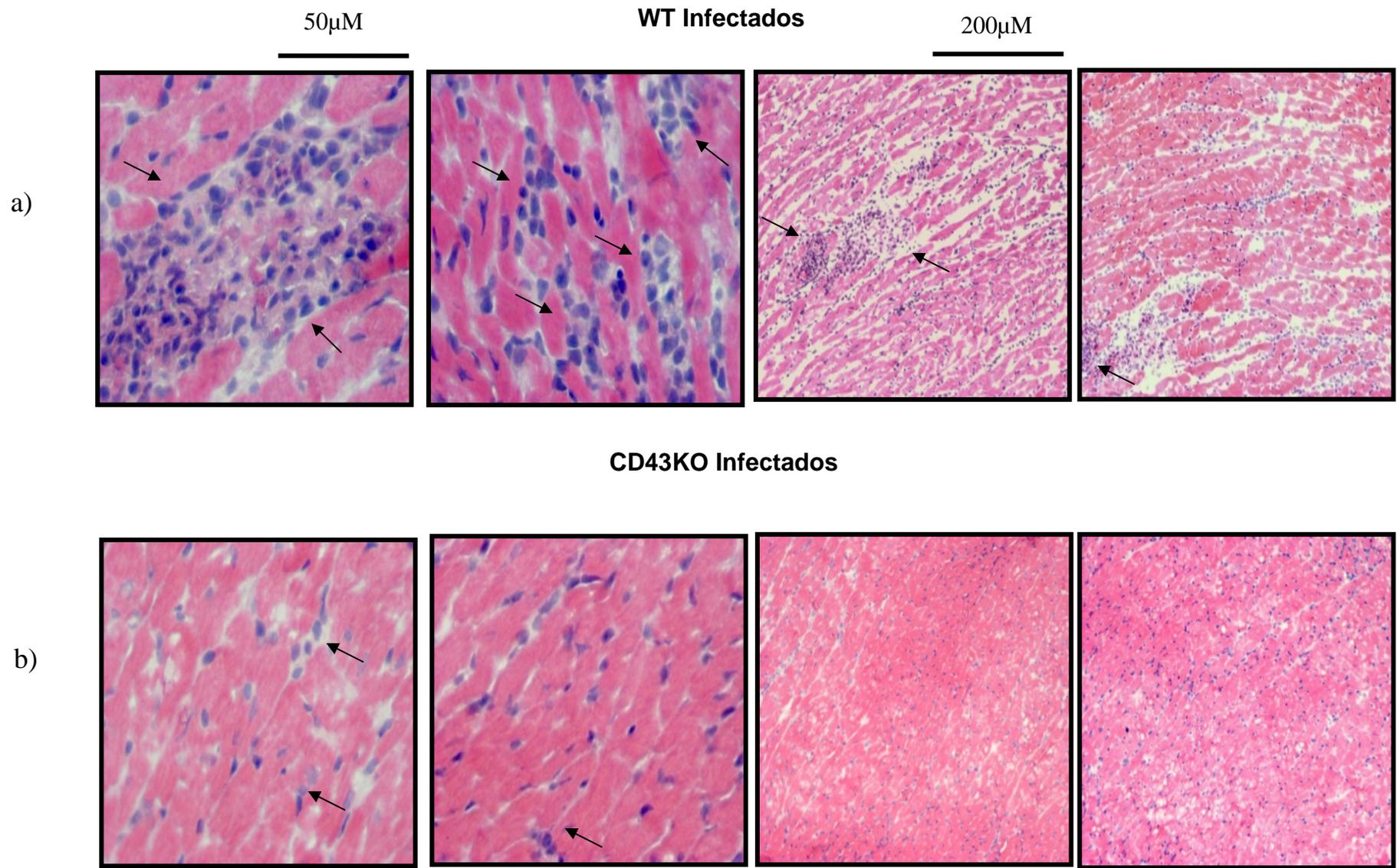


Figura 10. Ausência do CD43 provoca diminuição no percentual de células infiltrantes no tecido cardíaco. Os camundongos foram sacrificados no 15º dpi e os corações foram submetidos à digestão com colagenase IV. Os gráficos em ponto (a e b) mostram uma redução no percentual de leucócitos totais infiltrantes, e o gráfico em barras (c) representa a média de dois experimentos independentes (* $p < 0,05$).



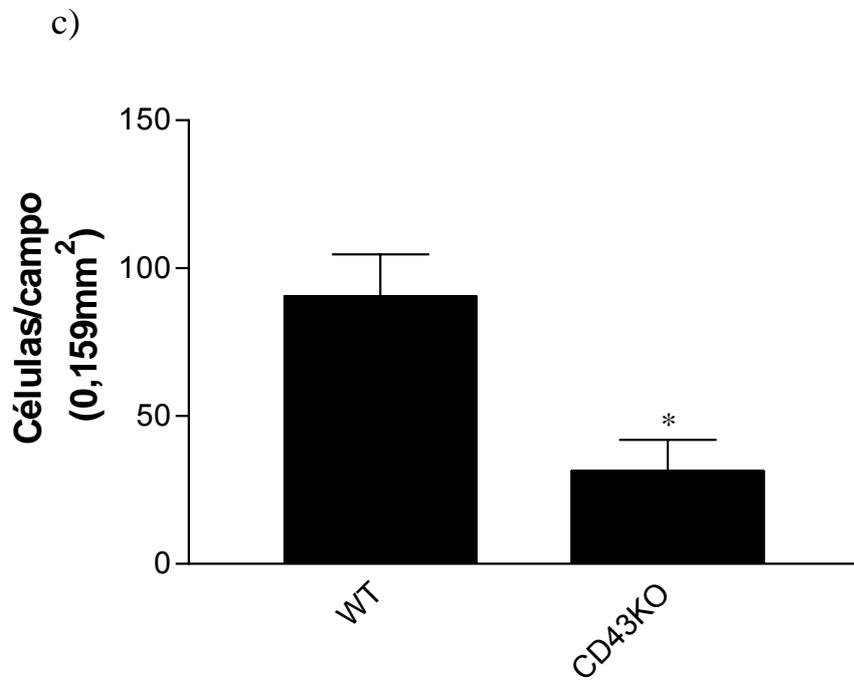


Figura 11. Camundongos CD43KO apresentaram redução no número absoluto de leucócitos infiltrantes. Os corações foram cortados em fatias de 6 μ M com auxílio de um criostato, fixados em formol tamponado durante 30 minutos e corados por hematoxilina e eosina. O número absoluto de células (Fig. c) foi avaliado a partir da contagem dos núcleos arredondados em 25 campos aleatórios de cada animal (Fig. a e b) As imagens são representativas de dois experimentos utilizando n = 5 (*p<0,05)

4.7 – Envolvimento do CD43 na lesão do tecido cardíaco durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Entre as características mais marcantes da fase aguda da doença de Chagas está a miocardite, onde a destruição dos cardiomiócitos se dá pelo parasitismo tecidual e pela intensa resposta inflamatória local (Rossi *et al.*, 1995; Parada *et al.*, 1997). Durante as análises do coração por histologia, observamos que a lesão tecidual nos animais WT infectados parecia ser maior (Fig 11b) e caracterizada por uma miocardite focal e infiltrado inflamatório linfocitário. No intuito de avaliar se a redução do infiltrado inflamatório nos camundongos deficientes em CD43 infectados resultava em menor necrose de cardiomiócitos, realizamos a dosagem da atividade da enzima creatina quinase – isotipo cardíaco - no plasma dos animais infectados no 15º dia após a infecção. Como esperado, a lesão no coração dos animais CD43KO infectados foi significativamente menor se comparada ao coração dos animais WT infectados (Fig.11). Esses resultados, que estão de acordo com os dados obtidos por citometria de fluxo e histologia, permitem correlacionar diretamente o infiltrado inflamatório com a lesão dos cardiomiócitos.

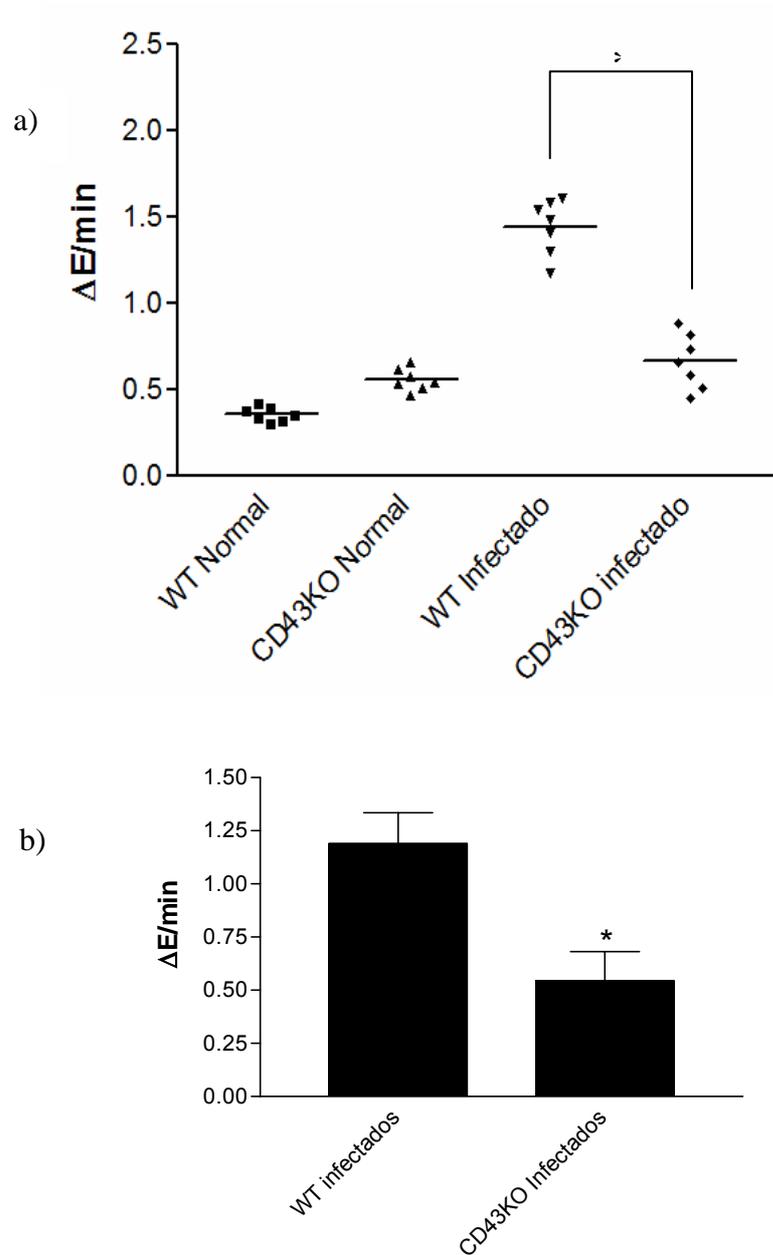


Figura 12. Avaliação da atividade plasmática da creatina quinase isotipo cardíaco (CK-MB). No 15º dpi os camundongos de cada grupo experimental foram sacrificados e o plasma, obtido por punção cardíaca, foi utilizado para a realização das reações. 5 μ l de plasma de cada camundongo foram adicionados a 125 μ l do reagente de trabalho fornecido pelo fabricante (Merck Labs) e as reações foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 340 nm a cada minuto durante 7 minutos consecutivos. Cada ponto no gráfico (a) é a média representativa das leituras do plasma de 4 animais diferentes em triplicata a cada minuto, em um total de 7 minutos (* $p < 0,05$). O gráfico (b) representa a variação dentro do mesmo grupo experimental e entre os diferentes grupos no 3º minuto da leitura.

4.8 – O tratamento de animais infectados com a TSi diminuiu a lesão cardíaca em camundongos selvagens, mas não em camundongos CD43KO.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que a forma inativa da *trans*-sialidase é capaz de se ligar de maneira lectínica ao CD43 presente na superfície de leucócitos (Todeschini *et al.*, 2002). Posteriormente observou-se que a injeção de TSi foi capaz de inibir a migração de ambos os subsets de linfócitos T para o coração dos camundongos infectados o que culminou com menor lesão cardíaca (Freire-de-Lima *et al.*, dados não publicados). Estes resultados sugerem que o efeito inibitório observado para a TSi sobre a migração de linfócitos para o coração ocorra pela interação da TSi com CD43. Visando comprovar essa hipótese, animais selvagens e CD43KO infectados foram tratados com doses diárias de 30 µg de TSi durante 3 dias por via endovenosa. Nós observamos que o tratamento de animais selvagens com a TSi levou à diminuição da lesão cardíaca, enquanto que o mesmo não foi observado nos camundongos deficientes em CD43 (Fig. 12). Juntos esses resultados permitem concluir que o CD43 está diretamente envolvido na migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco e na lesão dos cardiomiócitos durante a infecção pelo *T. cruzi*.

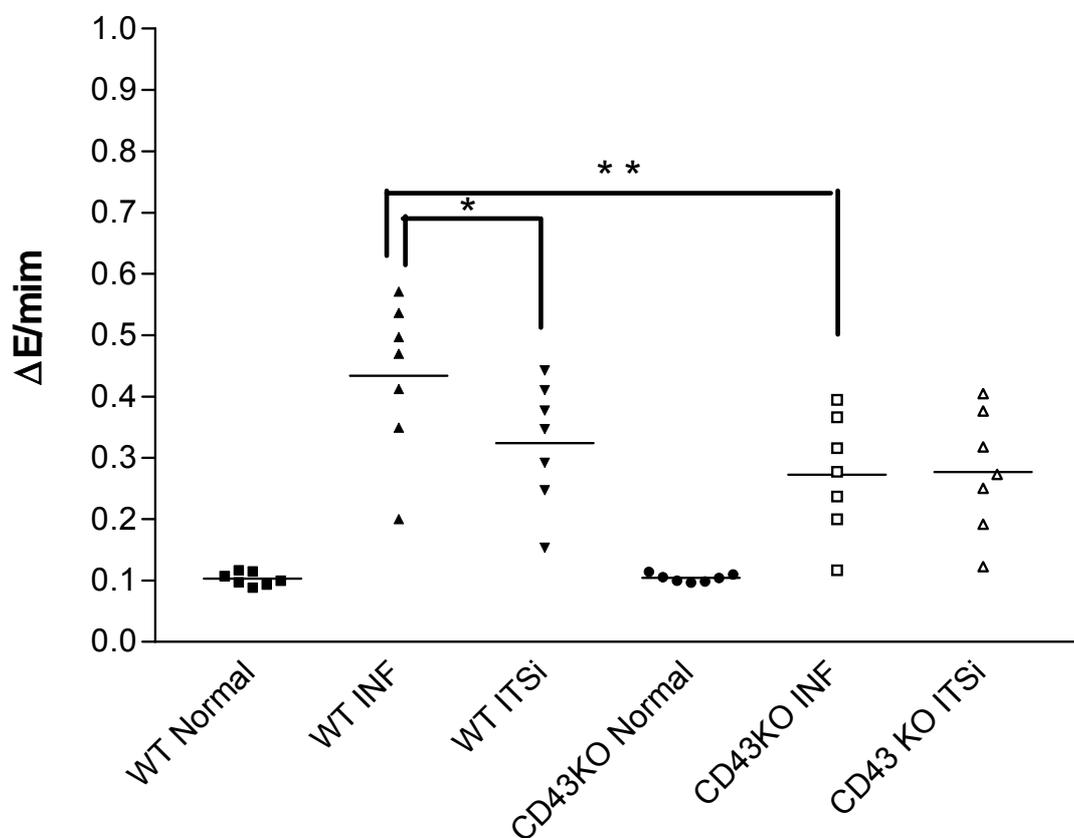


Figura 13. Efeito da TSi sobre a lesão cardíaca de camundongos selvagens e CD43KO infectados com *T. cruzi*. Os animais foram tratados com 30 μ g de TSi uma hora antes e nos dias 2 e 3 após a infecção por via endovenosa. No 15º dpi os camundongos de cada grupo experimental foram sacrificados e o plasma, obtido após a centrifugação (1500 xg) do sangue coletado por punção cardíaca, foi utilizado para a realização das reações. 5 μ l de plasma de cada camundongo foram adicionados a 125 μ l do reagente de trabalho fornecido pelo fabricante (Merck Labs) e as reações foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 340 nm a cada minuto durante 7 minutos consecutivos. O gráfico é média representativa de dois experimentos realizados em triplicata utilizando um n = 6 animais. (* p = 0,072; ** p = 0,026)

4.9 – A cardite chagásica crônica diminui nos camundongos CD43KO.

Sabe-se que a miocardite chagásica crônica é causada pela persistência do parasita no coração, pela resposta inflamatória induzida por ele e pelo desbalanço na autonomia cardíaca (Rossi *et al.*, 1995). Os sintomas e os sinais clínicos que ocorrem durante a fase aguda, estão correlacionados à cardiomiopatia chagásica crônica (Dias, 1989; Rossi *et al.*, 1995). Como mencionamos, os animais CD43KO apresentam lesão cardíaca menor durante a fase aguda e ainda, menor carga parasitária tecidual. No intuito de avaliar se o quadro observado durante a fase aguda teria influência na cardiomiopatia crônica, camundongos selvagens e CD43KO foram infectados com um inóculo de 100 tripomastigotas para que desenvolvessem a forma crônica da doença. Noventa dias após a infecção, os animais foram sacrificados e os corações removidos para quantificação do colágeno total através da coloração por picrossírius (Fig. 14). Mesmo infectando os animais um inóculo 100 vezes menor do que nos experimentos de fase aguda, não houve diferença significativa na parasitemia dos dois grupos (dados não mostrados). Observamos que os corações obtidos dos animais CD43KO eram visualmente menores do que dos animais selvagens (Fig. 14b). De fato, ao compararmos o peso seco do coração dos animais dos diferentes grupos, observamos que os corações dos camundongos CD43KO cronicamente infectados eram menos pesados que os corações dos animais selvagens (Fig. 14c). Entre os animais não infectados não foi observada diferença (Fig. 14a). Confirmando este resultado, ao analisarmos o tecido corado por picrossírius, foi possível observar que a deposição de fibras de colágeno foi aproximadamente 59% menor nos corações dos animais CD43KO cronicamente infectados se comparados aos animais selvagens (Fig. 15).

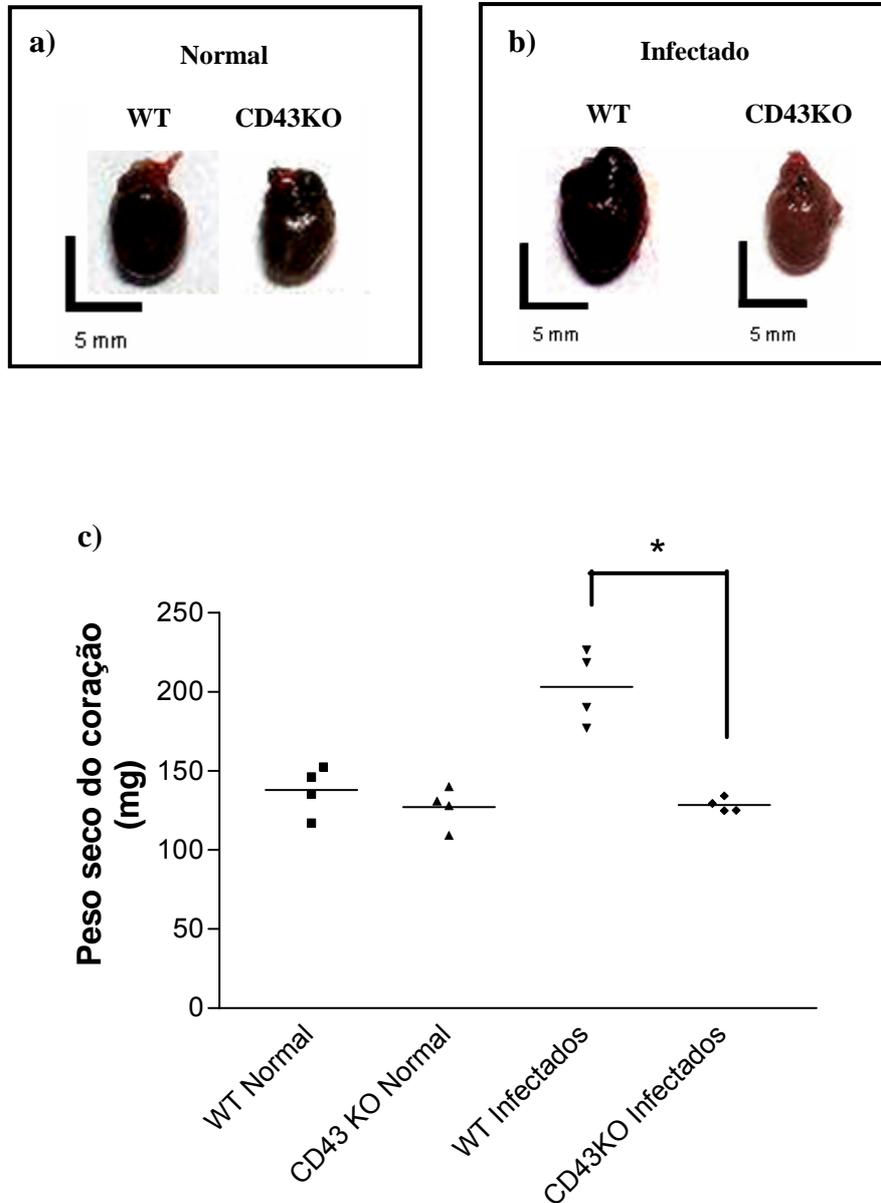


Figura 14. Avaliação do tamanho e peso seco dos corações de camundongos cronicamente infectados. Animais selvagens e CD43KO foram infectados com 100 tripomastigotas sanguíneas por via intraperitoneal e sacrificados 90 dias após a infecção. O peso seco dos órgãos foi aferido utilizando balança de precisão. n = 4 (*p<0,05).

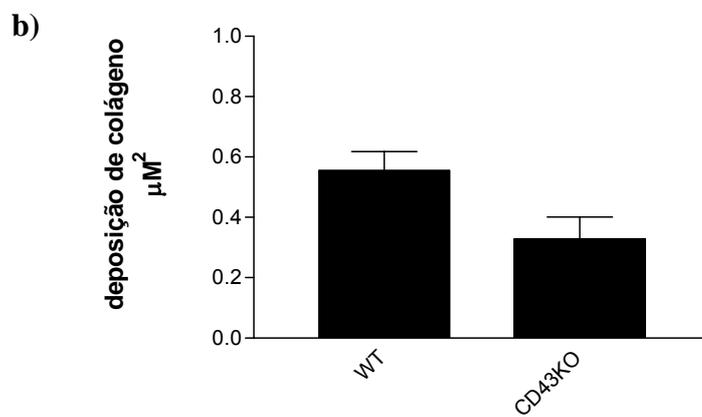
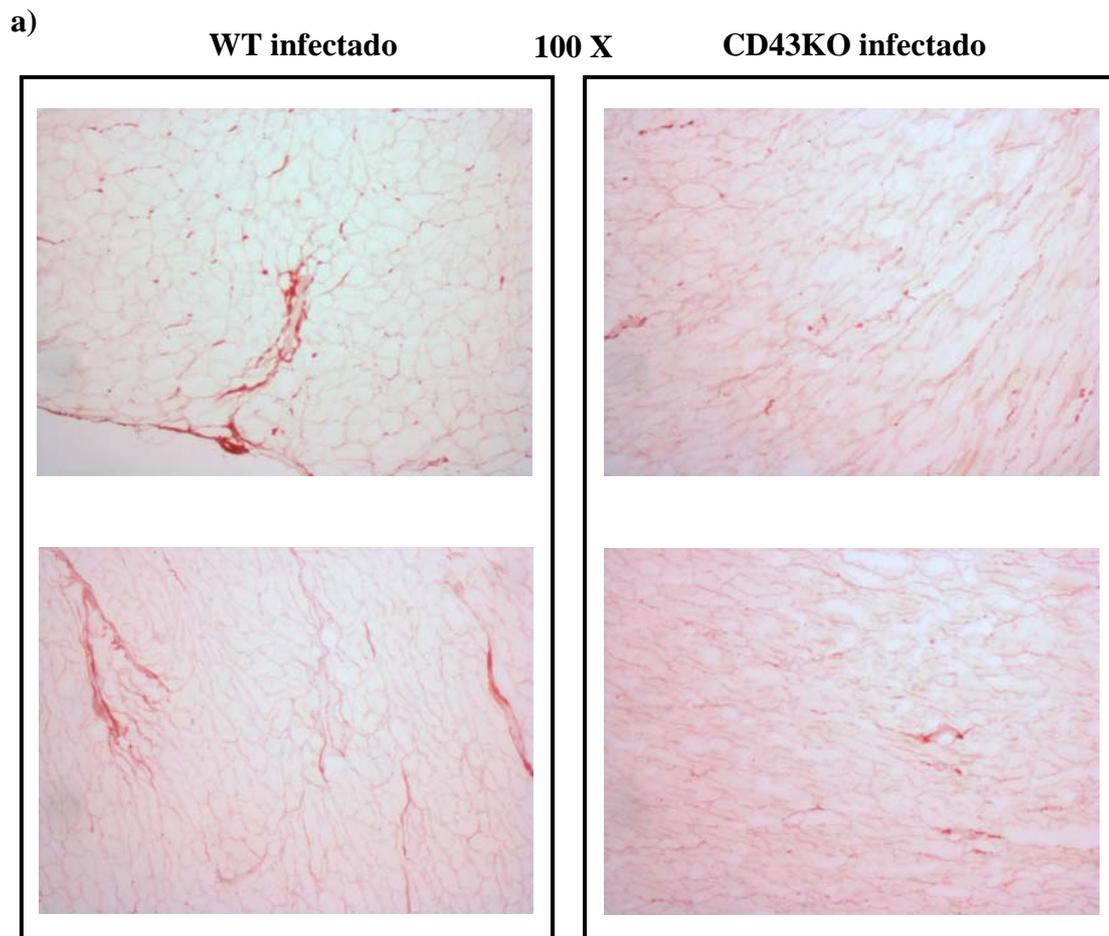


Figura 15. Coloração por picrosírius para quantificação do colágeno total. O tecido cardíaco previamente congelado foi fatiado em cortes de $8\mu\text{M}$ e aderidos em lâminas recobertas com poli-L-lisina. O material foi fixado em paraformaldeído e corado segundo o método descrito nos materiais e métodos.

5 - Discussão

Nesta dissertação, nós avaliamos o envolvimento do CD43 durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Utilizando como modelo experimental camundongos CD43KO observamos que apesar de desenvolver uma resposta do tipo Th₂, os animais nocautes não apresentaram diferença na parasitemia em relação aos animais selvagens infectados, o que provavelmente se deve ao fato da ausência do CD43 aumentar a citotoxicidade dos linfócitos. Adicionalmente, demonstramos que os animais CD43KO apresentaram redução na carga parasitária e no infiltrado inflamatório cardíacos, apresentando uma lesão tecidual menor. Esses dados poderiam explicar a sobrevida prolongada dos animais CD43KO em relação ao grupo selvagem. Além disso, a atenuação da miocardite aguda nos camundongos deficientes em CD43 culminou com diminuição da fibrose tecidual crônica. Juntos, nossos resultados evidenciam pela primeira vez a participação do CD43 em diferentes etapas da infecção murina pelo *T. cruzi*.

O comprometimento das linhagens de células T em uma infecção é caracterizado pelo perfil de citocinas secretadas por estas células e pela presença de fatores de transcrição que medeiam as alterações epigenéticas que favorecem a expressão dessas citocinas (revisto por Ansel *et al.*, 2003). Recentemente, Ramirez-Pliego e colaboradores (2007) descreveram que a combinação entre os sinais desencadeados pelo CD43 e pelo TCR aumentam a transcrição do gene de T-bet e a expressão de receptores de IL-12 e INF γ em células TCD4⁺, mecanismos envolvidos na polarização da resposta do tipo Th₁. De acordo com essas observações, foi demonstrado que células TCD4⁺ deficientes em CD43 apresentam comportamento predominantemente Th₂ (Cannon *et al.*, 2008). Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que a interação da TS do *T. cruzi* com o CD43 leva a produção de IFN- γ e IL-2, (Todeschini *et al.*, 2002) citocinas do tipo Th₁. Em nossos estudos demonstramos que, durante a infecção de animais C57Bl6 (com comportamento predominantemente Th₁) pelo *T. cruzi*, a ausência do CD43 levou ao desenvolvimento de uma resposta do tipo Th₂. A resposta do tipo Th₂ aumenta a susceptibilidade dos camundongos, favorecendo a permanência do parasita (revisto por DosReis *et al.*, 2005). No entanto, surpreendentemente, os

animais não foram mais susceptíveis à infecção. Isto poderia ser explicado pelo aumento da atividade citotóxica dos linfócitos esplênicos obtidos dos camundongos deficientes em CD43. O CD43 é uma mucina de superfície que atua como uma barreira físico-química devido a grande quantidade de carga negativa conferida pelo ácido siálico (revisado por (Varki & Varki, 2007). Dados recentes do nosso laboratório (Freire-de-Lima *et al.*, 2009) suportam a idéia de que o ácido siálico compromete a interação entre célula apresentadora e célula infectada com *T. cruzi*. Estudos *in vitro* e *in vivo* em nosso laboratório demonstraram que as asialoglicoproteínas presentes na superfície de células T ativadas (após a ativação os linfócitos passam a apresentar uma maior quantidade de moléculas contendo unidades terminais de β Gal, devido a redução das atividades α 2,3 e α 2,6 sialiltransferase (Comelli *et al.*, 2006; Amado *et al.*, 2003; Chervenak & Cohen, 1982), atuam como receptores de ácido siálico em uma reação catalisada pela TSa do *T. cruzi*. Demonstramos que a TSa transfere ácido siálico para superfície de células TCD8⁺ ativadas durante a infecção, diminuindo a atividade citotóxica dessas células. Linfócitos TCD8⁺ CD44^{high} PNA^{low} de camundongos infectados com o *T. cruzi* apresentam um aumento na ligação do anticorpo monoclonal S7 que reconhece a isoforma de baixo peso molecular (115 kDa) sialilada do CD43, sugerindo que a leucosialina CD43 seja o receptor de ácido siálico na superfície de células TCD8⁺ durante a infecção pelo *T. cruzi*. Esses resultados mostram que o ácido siálico, presente no CD43, atua como barreira física inibindo o contato entre célula apresentadora e célula efetora e ainda, que a re-sialilação catalisada pela TS é um mecanismo sofisticado através do qual o parasita conseguiria subverter a resposta antígeno específica, favorecendo sua permanência no hospedeiro (Freire-de-lima *et al.*, 2009).

Baseado no fato de que a produção de anticorpos induzida pela resposta Th₂ está diretamente relacionada ao controle da parasitemia (Umekita & Mota, 2000), é plausível propor que os níveis de imunoglobulinas podem ser maiores nos animais CD43KO. Essa hipótese será avaliada na continuação do nosso trabalho.

Durante um processo infeccioso, o recrutamento e a migração de leucócitos para tecidos alvo é fundamental para a resolução da infecção.

Ambas as etapas são mediadas por quimiocinas e são dependentes do estado de ativação dos leucócitos, da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , das moléculas de adesão e de componentes da matriz extracelular. Selectinas funcionam como ligantes para moléculas presentes na superfície dos leucócitos circulantes que, ao interagirem com essas moléculas, rolam mais lentamente pelo endotélio. Ao rolar pela parede dos vasos endoteliais, os leucócitos interagem de maneira mais forte com integrinas tais como ICAM e VCAM, processo que permite que as células extravasem da circulação para dentro do tecido inflamado (Shimizu & Shaw 1991, Sallusto *et al.*, 2000; Moser & Loetscher 2001). O CD43 atua como um ligante de E-selectina (Matsumoto *et al.*, 2005 e 2007; Fuhlbrigge *et al.*, 2006; Alcaide *et al.*, 2007) e vários trabalhos mostram o envolvimento da molécula no recrutamento de leucócitos para sítios inflamatórios. Porém, o envolvimento direto do CD43 na migração de leucócitos é um tema bastante controverso. Há autores que propõem que a ausência do CD43 compromete a chegada de células aos tecidos inflamados (McCevoy *et al.*, 1997; Ford *et al.*, 2003), outros que sugerem que o CD43 funciona como molécula anti-adesiva (Woodman *et al.*, 1998) e ainda outros que dizem que a molécula não é relevante durante este processo (Carlow & Ziltener, 2006). No entanto, mais recentemente foi proposto que, a participação do CD43 na migração de leucócitos depende do tecido alvo e das condições inflamatórias, onde a leucosialina pode atuar como molécula de adesão ou como molécula anti-adesiva (Matsumoto *et al.*, 2008). Exemplificando, há modelos onde o rolamento dos leucócitos é mais dependente de P-selectina (inflamação induzido por trauma em músculo cremaster (Yang *et al.*, 1999) e outros onde o rolamento é majoritariamente via E-selectina (endotélio venoso estimulado por TNF- α (Xia *et al.*, 2002). As divergências encontradas sobre a participação do CD43 durante o recrutamento de leucócitos poderiam ser explicadas pelo contexto inflamatório.

Baseado nestas informações, é fundamental conhecer as moléculas de adesão endoteliais que medeiam a interação com os leucócitos durante a infecção pelo *T. cruzi*. Tanowitz e colaboradores (1992) demonstraram que células endoteliais infectadas pelo *T. cruzi* produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6. Anos mais tarde, Huang e colaboradores (1999)

descreveram que IL-1 β e IL-6 juntamente com o TNF- α circulante (Tarleton, 1988) atuam sobre o endotélio induzindo o aumento da expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina. Recentemente demonstramos, que a TS do *T. cruzi* liga-se à superfície de células endoteliais aumentando a expressão de ICAM, VCAM e E-selectina (Dias *et al.*, 2008). Seria então, plausível propor que o CD43 estivesse diretamente envolvido no recrutamento de linfócitos para os tecidos alvo, uma vez que na infecção pelo *T. cruzi* há aumento na expressão de E-selectina (ligante *in vivo* para o CD43 presente em linfócitos T ativados). (Alcaide *et al.*, 2007). Esta hipótese é suportada pelos resultados obtidos no presente trabalho, onde observamos que camundongos CD43KO infectados com a cepa Y do *T. cruzi* apresentaram redução significativa no percentual e no número absoluto de células inflamatórias no tecido cardíaco e que isso foi mais evidente para a subpopulação de linfócitos TCD8⁺, sugerindo que o CD43 é importante no processo de recrutamento de linfócitos durante a fase aguda da doença de Chagas. O aumento na expressão de E-selectina pode favorecer a interação do endotélio com o CD43, o que explica o fato de a ausência da molécula em nosso modelo, comprometer a chegada das células ao tecido cardíaco. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório reforçam a idéia de que o CD43 é importante no recrutamento de células inflamatórias durante a fase aguda da infecção. Neutrófilos pré-incubados com a *trans*-sialidase inativa (TSi), enzima capaz de se ligar de maneira lectínica ao CD43 (Todeschini *et al.*, 2002b), aderem menos a células endoteliais estimuladas com LPS e ou TNF- α (Faragasso, 2007). Além disso, observamos que o tratamento com a TSi, inibiu a migração de linfócitos T para o tecido cardíaco de camundongos infectados (Freire-de-Lima, 2008).

A diminuição do infiltrado inflamatório e da carga parasitária no tecido cardíaco corroboram com a observação de que os animais CD43KO infectados apresentaram menos lesão cardíaca. O ensaio da atividade da enzima creatina quinase demonstrou que a lesão dos animais selvagens, onde a carga parasitária e a inflamação são intensas, é significativamente maior do que a lesão observada nos animais CD43KO infectados. De maneira interessante, o tratamento de camundongos CD43KO com a TSi não provocou alteração no

perfil de células inflamatórias (dados não mostrados) e nem na atividade plasmática da creatina cinase. A observação de que o tratamento de camundongos CD43KO com a TSi não provocou alteração na atividade plasmática da creatina cinase reforça a hipótese de que o CD43 está envolvido na migração de células para o tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Nossos resultados sugerem que a interação lectínica do CD43 com a TSi pode comprometer a ligação da leucosialina com E-selectina, o que poderia explicar o fenômeno observado ao analisar o infiltrado inflamatório cardíaco.

Apesar da contradição aparente entre diminuição de células TCD8⁺ no tecido e diminuição da carga parasitária, nós observamos que as células deficientes em CD43 são mais citotóxicas do que as selvagens. Além disso, estudos prévios, (Russo *et al.*, 1996) mostraram que a depleção de células TCD8⁺ não resultou em aumento significativo da carga parasitária do tecido cardíaco sugerindo que a atividade dos diferentes tipos de células T varia de acordo com o tecido infectado. Portanto, para chegarmos a uma conclusão mais convicta de que a atividade efetora das células TCD8⁺ é a responsável pelo fenômeno observado, seria necessário avaliar o perfil geral citocinas no tecido cardíaco (expressão de RNA para diferentes citocinas ou ELISA do sobrenadante do tecido digerido) ou ainda o percentual de células NK. Além disso, é plausível propor que as células TCD8⁺ permaneçam por mais tempo no tecido cardíaco dos animais CD43KO, pois foi demonstrado que células TCD8⁺ antigênio específicas de camundongos deficientes em CD43 expressam quantidades elevadas de Bcl-2, são mais resistentes a apoptose durante a fase de contração da resposta efetora e persistem por mais tempo *in vivo*. Esse fenômeno foi observado em modelo de infecção por agente viral e também em modelo de transplante alográfico (Onami *et al.*, 2002).

A análise do perfil de deposição de fibras de colágeno no coração em animais CD43KO cronicamente infectados, revelou que nesses animais, a fibrose crônica é menor se comparada àquela vista nos camundongos selvagens (que apresentaram maior lesão tecidual e maior carga parasitária no coração durante a fase aguda). Esses dados corroboram a hipótese de que os eventos que ocorrem durante a fase aguda da infecção como lesão das fibras

cardíacas, dada à presença de parasitas nos cardiomiócitos e ao intenso infiltrado inflamatório local, estão positivamente relacionados com aqueles observados na infecção crônica (Dias, 1989).

Nossos resultados permitem apontar o CD43 como um alvo terapêutico visando à atenuação do processo inflamatório cardíaco que ocorre durante a fase aguda da doença de Chagas. Tal abordagem já foi utilizada com sucesso anteriormente em modelos de doenças auto-imunes. Johnson e colaboradores (1999) utilizaram anticorpos monoclonais anti-CD43 clone L11 para bloquear a migração de células T para as ilhotas do pâncreas, prevenindo o desenvolvimento da diabetes insulino-dependente em camundongos não obesos. Portanto, nós concluímos que a sialoglicoproteína CD43 está diretamente envolvida em diferentes etapas da infecção pelo *T. cruzi* e que a utilização de anticorpos anti-CD43 ou outro ligante, como por exemplo a TSi, poderia atenuar os eventos que ocorrem durante a miocardite aguda e a evolução para a cardiomiopatia chagásica crônica.

6 – Conclusões

- Ausência do CD43 induz comprometimento com a linhagem Th2 e aumenta a citotoxicidade *ex vivo*;
- Ausência do CD43 não reflete na cinética da parasitemia porém leva a diminuição da carga parasitária no coração;
- CD43KO apresentam redução no número de leucócitos infiltrantes e concomitantemente menos lesão dos cardiomiócitos;
- CD43KO é mais resistente à infecção pelo *T cruzi*;
- Esses resultados apontam o CD43 como alvo potencial de intervenção terapêutica para atenuar a cardiomiopatia aguda e a fibrose crônica.

7 – Perspectivas

- Dosagem de imunoglobulinas do 5º ao 15º dias após a infecção no soro de camundongos selvagens e CD43KO infectados;
- Transferência adotiva de linfócitos T de animais selvagens para os CD43KO infectados: análise da atividade creatina cinase e do perfil de infiltrado inflamatório;
- Microscopia *in vivo* para avaliar a presença de células transferidas;
- Ensaio de citotoxicidade com células T obtidas do infiltrado inflamatório cardíaco.
- Imunofluorescência para detecção de osteopontina e fibronectina em tecido cardíaco de animais cronicamente infectados.

8 – Referências bibliográficas:

- Abramson JS, Hudnor HR. Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood*. 1995 Mar 15;85(6):1615-9.
- Abramson JS, Mills EL. Depression of neutrophil function induced by viruses and its role in secondary microbial infections. *Rev Infect Dis*. 1988 Mar-Apr;10(2):326-41.
- Abramson JS, Parce JW, Lewis JC, Lyles DS, Mills EL, Nelson RD, Bass DA. Characterization of the effect of influenza virus on polymorphonuclear leukocyte membrane responses. *Blood*. 1984 Jul;64(1):131-8.
- Alcaide P, King SL, Dimitroff CJ, Lim YC, Fuhlbrigge RC, Luscinskas FW The 130-kDa glycoform of CD43 functions as an E-selectin ligand for activated Th1 cells in vitro and in delayed-type hypersensitivity reactions in vivo *J Invest Dermatol*. 2007 Aug;127(8):1964-72.
- Allenspach EJ, Cullinan P, Tong J, Tang Q, Tesciuba AG, Cannon JL, Takahashi SM, Morgan R, Burkhardt JK, Sperling AI. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse *Immunity*. 2001 Nov;15(5):739-50
- Amado, M; Galvan, M; He, J & Baum, L.G. 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*. 2003 278: 7469-7475
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Baeckström D, Haass C, Hansson GC. Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochem J*. 2005 Apr 15;387(Pt 2):377-84.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Sikut R, Sikut A, Baeckström D, Hansson GC. CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Mar 26;316(1):12-7.

- Andrade SG, Grimaud JA, Stocker-Guerret S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Mar;40(3):252-60.
- Andrade, L.O., Andrews, N.W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005 3:819-23.
- Andrews, N.W.. From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1994 27: 471-475
- Ansel KM, Lee DU, Rao A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2003 Jul;4(7):616-23.
- Ardman B, Sikorski MA, Settles M, Staunton DE. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J Exp Med.* 1990 Oct 1;172(4):1151-8.
- Ardman B, Sikorski MA, Staunton DE. CD43 interferes with T-lymphocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jun 1;89(11):5001-5.
- Axelsson B, Youseffi-Etemad R, Hammarström S, Perlmann P Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43 *J Immunol.* 1988 Nov 1;141(9):2912-7
- Baecher CM, Infante AJ, Semcheski KL, Frelinger JG. Identification and characterization of a mouse cell surface antigen with alternative molecular forms *Immunogenetics.* 1988; 28(5):295-302
- Barat C, Tremblay MJ. Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation.
- Bazil V, Brandt J, Tsukamoto A, Hoffman R. Apoptosis of human hematopoietic progenitor cells induced by crosslinking of surface CD43, the major sialoglycoprotein of leukocytes *Blood.* 1995 Jul 15;86(2):502-11
- Bento, C.A; Melo, M.B; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L & Pecanha, L.M. Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production in vitro. *J. Immunol.* 1996 157: 4996-5001

- Berenson LS, Ota N, Murphy KM Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:157-74. Review
- Black CM, Israelski DM, Suzuki Y, Remington JS. Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. *Immunology.* 1989 Dec;68(4):570-4.
- Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto N.. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2000 Segunda edição, ed. Guanabara Koogan S.A.
- Brener, Z . Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1973;27: 347-382.
- Burleigh, B.A. & Andrews, N.W.. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995 49: 175-200
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991 Dec 20;67(6):1033-6
- Camargo, M.M; Almeida, I.C; Pereira, M.E; Ferguson, M.A; Travassos, L.R & Gazzinelli, R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J. Immunol.* 1997 158: 5890-5901
- Cannon JL, Collins A, Mody PD, Balachandran D, Henriksen KJ, Smith CE, Tong J, Clay BS, Miller SD, Sperling AI. CD43 regulates Th2 differentiation and inflammation *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7385-93.
- Carlow DA, Ziltener HJ. CD43 deficiency has no impact in competitive in vivo assays of neutrophil or activated T cell recruitment efficiency. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177(9):6450-9.
- Carlsson SR, Sasaki H, Fukuda M. Structural variations of O-linked oligosaccharides present in leukosialin isolated from erythroid, myeloid, and T-lymphoid cell lines *J Biol Chem.* 1986 Sep 25;261(27):12787-95.
- Cassidy LF, Lyles DS, Abramson JS. Depression of polymorphonuclear leukocyte functions by purified influenza virus hemagglutinin and sialic acid-binding lectins. *J Immunol.* 1989 Jun 15;142(12):4401-6

- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol.* 2000;22(4):345-69
- Cazzulo, J.J & Frasch, A.C.. SAPA/trans-sialidase and cruzipain: two antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB. J.* 1992 6: 3259-3264
- Cermák L, Símová S, Pintzas A, Horejsí V, Andera L Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):7955-61
- Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Colston JT, Freeman GL. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998 Apr;152(4):925-34.
- Chaussabel D, Pajak B, Vercruyse V, Bisseyé C, Garzé V, Habib M, Goldman M, Moser M, Vray B. Alteration of migration and maturation of dendritic cells and T-cell depletion in the course of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Lab Invest.* 2003 Sep;83(9):1373-82.
- Chervenak, R & Cohen, J.J. Peanut lectin binding as a marker for activated T-lineage lymphocytes. *Thymus.* 1982 4: 61-67
- Chuenkova, M & Pereira, M.E. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: enhancement of virulence in a murine model of Chagas' disease. *J. Exp. Med.* 1995 1: 1693-1703
- 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. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol.* 2006 15: 2431-2440
- Copelan EA, McGuire EA. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults *Blood.* 1995 Mar 1;85(5):1151-68.

- Coura JR. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102:113-122.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A., Miles, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002 18:171-6.
- Cremona, M.L; Campetella, O; Sánchez, D.O & Frasch, A.C. Enzymically inactive members of the *trans*-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. *Glycobiology.* 1999 9: 581-587
- Cummings, K.L & Tarleton, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003 129: 53-59
- Cyster J, Somoza C, Killeen N, Williams AF. Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *Eur J Immunol.* 1990 Apr;20(4):875-81.
- Cyster JG, Shotton DM, Williams AF. The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* 1991 Apr;10(4):893-902.
- Cyster JG, Shotton DM, Williams AF. The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* 1991 Apr;10(4):893-902.
- de Souza, A.P; Olivieri, B.P; de Castro, S.L & Araújo-Jorge, T.C. Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. *Parasitol. Res* 2000. 86: 800-808
- Delon J, Kaibuchi K, Germain RN Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin *Immunity.* 2001 Nov;15(5):691-701.
- Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989 Jul-Sep;22(3):147-56.

- Dias WB, Fajardo FD, Graça-Souza AV, Freire-de-Lima L, Vieira F, Girard MF, Bouteille B, Previato JO, Mendonça-Previato L, Todeschini AR. Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 2008 Jan;10(1):88-99.
- dos Santos PV, Roffê E, Santiago HC, Torres RA, Marino AP, Paiva CN, Silva AA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J. 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.* 2001 Oct;3(12):971-84.
- DosReis GA, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LV, Lopes MF. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Feb-Apr;18(1-2):97-105
- dosReis GA. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today.* 1997 Sep;13(9):335-42.
- DosReis, G.A; Freire-de-Lima, C.G; Nunes, M.P & Lopes, M.F.. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. *Trends. Parasitol.* 2005 21: 237-243
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA.* 1999 Aug 18;282(7):677-86.
- Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglione MC. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally. *JAMA.* 2005 Jun 8;293(22):2767-75.
- Dyer MJ, Hunt SV. Committed T lymphocyte stem cells of rats. Characterization by surface W3/13 antigen and radiosensitivity. *J Exp Med.* 1981 Oct 1;154(4):1164-77.
- Ellies LG, Jones AT, Williams MJ, Ziltener HJ. Differential regulation of CD43 glycoforms on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in graft-versus-host disease *Glycobiology.* 1994 Dec;4(6):885-93.

- Faragasso, MS. Efeitos da *trans*-sialidase inativa do *Trypanosoma cruzi* sobre neutrófilos humanos: implicações no processo inflamatório da doença de Chagas. Rio de Janeiro, 2006. Dissertação (Mestrado em ciências) Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro 2006.
- Fauci AS. The Jules Bordet Lecture. Immunopathogenesis of HIV infection. Ann N Y Acad Sci. 1993 Jun 23;685:408-19.
- Fernandez-Rodriguez J, Andersson CX, Laos S, Baeckström D, Sikut A, Sikut R, Hansson GC. The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. Tumour Biol. 2002 Jul-Aug;23(4):193-201
- Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, Baba TW, Ruprecht RM, Kupfer A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. Nat Med. 1995 Feb;1(2):129-34.
- Ford ML, Evavold BD Modulation of MOG 37-50-specific CD8+ T cell activation and expansion by CD43. Cell Immunol. 2006 Mar;240(1):53-61.
- Ford ML, Onami TM, Sperling AI, Ahmed R, Evavold BD. CD43 modulates severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis Immunol. 2003 Dec 15;171(12):6527-33.
- Fratazzi C, Manjunath N, Arbeit RD, Carini C, Gerken TA, Ardman B, Remold-O'Donnell E, Remold HG. A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43. J Exp Med. 2000 Jul 17;192(2):183-92.
- 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. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*. 2000 13: 199-203
- Freire-de-Lima, L. Mecanismos moleculares que contribuem para que a *trans*-sialidase atue como fator de virulência durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro, 2006. Tese (Doutorado em ciências)

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Universidade Federal do Rio de Janeiro 2006.

Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Double knockout highlights value of endothelial selectins *Immunol Today*. 1996 May;17(5):205.

Fuhlbrigge RC, King SL, Sackstein R, Kupper TS. CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1421-6. Epub 2005 Nov 3.

Fukuda M, Carlsson SR. Leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes as differentiation antigens *Med Biol*. 1986;64(6):335-43.

Gahmberg CG, Häyry P, Andersson LC. Characterization of surface glycoproteins of mouse lymphoid cells. *J Cell Biol*. 1976 Mar;68(3):642-53.

Gao W, Pereira MA. *Trypanosoma cruzi* *trans*-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. *Eur J Immunol*. 2001 May;31(5):1503-12.

Gao, W; Wortis, H.H; Pereira, M.A. The *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int. Immunol*. 2002 14: 299-308

Garg, N & Tarleton, R.L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun*. 2002 70: 5547–5555

Gaynor CD, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*. 1995 Dec 1;155(11):5343-51.

Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*. 1990 Feb 22;343(6260):757-60.

Giordanengo V, Limouse M, Desroys du Roure L, Cottalorda J, Doglio A, Passeron A, Fuzibet JG, Lefebvre JC. Autoantibodies directed against

CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals. *Blood*. 1995 Sep 15;86(6):2302-11.

Giordanengo V, Limouse M, Peyron JF, Lefebvre JC Lymphocytic CD43 and CD45 bear sulfate residues potentially implicated in cell to cell interactions. *Eur J Immunol*. 1995 Jan;25(1):274-8.

Gironès N, Fresno M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*. 2003 Jan;19(1):19-22

Gulley ML, Ogata LC, Thorson JA, Dailey MO, Kemp JD. Identification of a murine pan-T cell antigen which is also expressed during the terminal phases of B cell differentiation. *J Immunol*. 1988 Jun 1;140(11):3751-7.

Hartshorn KL, Liou LS, White MR, Kazhdan MM, Tauber JL, Tauber AI. Neutrophil deactivation by influenza A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins. *J Immunol*. 1995 Apr 15;154(8):3952-60.

He YW, Bevan MJ High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis *J Exp Med*. 1999 Dec 20;190(12):1903-8

Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5328-36.

Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):477-89.

Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol*. 1987 Nov;10(11):665-70.

Hoare, C. A. *The Trypanosomes of Mammals*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1972 p. 749.

Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in

Trypanosoma cruzi-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000 Jul;68(7):4075-83.

Huang H, Calderon TM, Berman JW, Braunstein VL, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect Immun.* 1999 Oct;67(10):5434-40.

Ianni, B.M., Mady, C. The sugarcane juice was delicious, but... *Arq Bras Cardiol.* 2005 85:379-8

Imai K, Morio T, Zhu Y, Jin Y, Itoh S, Kajiwara M, Yata J, Mizutani S, Ochs HD, Nonoyama S. Clinical course of patients with WASP gene mutations *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):456-64.

Johnson GG, Mikulowska A, Butcher EC, McEvoy LM, Michie AS Anti-CD43 monoclonal antibody L11 blocks migration of T cells to inflamed pancreatic islets and prevents development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5678-85.

Jones AT, Federspiel B, Ellies LG, Williams MJ, Burgener R, Duronio V, Smith CA, Takei F, Ziltener HJ. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J Immunol.* 1994 Oct 15;153(8):3426-39.

Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1973 Oct;3(10):645-9.

Jung U, Ley K Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol.* 1999 Jun 1;162(11):6755-62

Kansas GS, Pavalko FM. The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion *J Immunol.* 1996 Jul 1;157(1):321-5.

Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996 Nov 1;88(9):3259-87.

- Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jul;120(1):3-10. Epub 2007 Jun 7.
- Khan S, Holding S, Doré PC, Sewell WA. Abnormal O-glycosylation of CD43 may account for some features of Wiskott-Aldrich syndrome *Med Hypotheses*. 2008;70(2):269-72.
- Killeen N, Barclay AN, Willis AC, Williams AF. The sequence of rat leukosialin (W3/13 antigen) reveals a molecule with O-linked glycosylation of one third of its extracellular amino acids. *EMBO J*. 1987 Dec 20;6(13):4029-34.
- Kim HJ, Park HJ, Park WS, Bae Y. CD43 cross-linking increases the Fas-induced apoptosis through induction of Fas aggregation in Jurkat T-cells *Exp Mol Med*. 2006 Aug 31;38(4):357-63
- Koppel EA, Saeland E, de Cooker DJ, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN specifically recognizes *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3 and 14. *Immunobiology*. 2005;210(2-4):203-10.
- Kuijpers TW, Hoogerwerf M, Kuijpers KC, Schwartz BR, Harlan JM Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way *J Immunol*. 1992 Aug 1;149(3):998-1003.
- Lannes-Vieira J. Trypanosoma cruzi-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential therapeutic targets to control chronic inflammation? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003 Apr;98(3):299-304.
- Laucella S, Salcedo R, Castaños-Velez E, Riarte A, De Titto EH, Patarroyo M, Orn A, Rottenberg ME. Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol*. 1996 May;18(5):227-39.
- Leavey JK, Tarleton RL. Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 2003 Mar 1;170(5):2264-8.

- Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:221-53.
- Leon JS, Engman DM The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci.* 2003 May 1;8: e 315-22.
- Levy JA. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS.* 1993 Nov;7(11):1401-10
- Lopes MF, DosReis GA. Trypanosoma cruzi-induced immunosuppression: selective triggering of CD4+ T-cell death by the T-cell receptor-CD3 pathway and not by the CD69 or Ly-6 activation pathway. *Infect Immun.* 1996;64(5):1559-64.
- Lopes MF, Nunes MP, Henriques-Pons A, Giese N, Morse HC 3rd, Davidson WF, Araújo-Jorge TC, DosReis GA. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to Trypanosoma cruzi infection due to a Th2-biased host immune response. *Eur J Immunol.* 1999 Jan;29(1):81-9.
- Lopes, M.F; da Veiga, V.F; Santos, A.R; Fonseca, M.E & DosReis, G.A. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 1995 15: 744-752
- Lopes, M.F; da Veiga, V.F; Santos, A.R; Fonseca, M.E & DosReis, G.A. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 1995 15: 744-752
- Lowe JB. Glycosylation in the control of selectin counter-receptor structure and function. *Immunol Rev.* 2002 Aug;186:19-36.
- Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43 *Nature.* 1995 Oct 12;377(6549):535-8.
- Manjunath N, Johnson RS, Staunton DE, Pasqualini R, Ardman B. Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion *J Immunol.* 1993 Aug 1;151(3):1528-34
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007 Mar 6;115(9):1109-23.

- Marshall D, Haskard DO Quantifying inflammation in vivo using radiolabeled antibodies and leukocytes *Methods Mol Biol.* 2003;225:273-82
- 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
- Matsumoto M, Atarashi K, Umemoto E, Furukawa Y, Shigeta A, Miyasaka M, Hirata T. CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells *J Immunol.* 2005 Dec 15;175(12):8042-50.
- Matsumoto M, Shigeta A, Miyasaka M, Hirata T. CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil rolling in a context-dependent manner. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3628-35.
- Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell.* 1993 Aug 13;74(3):541-54.
- McEvoy LM, Jutila MA, Tsao PS, Cooke JP, Butcher EC Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis *Blood.* 1997 Nov 1;90(9):3587-94.
- McEvoy LM, Sun H, Frelinger JG, Butcher EC Anti-CD43 inhibition of T cell homing *Exp Med.* 1997 Apr 21;185(8):1493-8.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 1997 May 15;16(10):2794-804.
- Michailowsky V, Celes MR, Marino AP, Silva AA, Vieira LQ, Rossi MA, Gazzinelli RT, Lannes-Vieira J, Silva JS Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 2004 Jul 1;173(1):463-70.
- Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 2004 Nov;4(11):841-55. Review.

- Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B, Andrade L, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coutinho A. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol.* 1988 Nov;28(5):553-61.
- Minoprio P, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J Immunol.* 1987 Jul 15;139(2):545-50.
- Minoprio, P.M; Eisen, H; Forni, L; D'Imperio Lima, M.R; Joskowicz, M & Coutinho, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand. J. Immunol.* 1986 24: 661-668
- Moll H. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol.* 2003 Aug;5(8):493-500.
- Moncayo, A., Ortiz Yanine, M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 2006 100:663-77.
- Moser B, Loetscher P Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):123-8
- Mowen KA, Glimcher LH. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:203-22. Review.
- Mucci, J; Hidalgo, A; Mocetti, E; Argibay, P.F; Leguizamon, M.S & Campetella, O. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by *trans*-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2002 99: 3896-3901
- Müller G, Lipp M Shaping up adaptive immunity: the impact of CCR7 and CXCR5 on lymphocyte trafficking. *Microcirculation.* 2003 Jun;10(3-4):325-34
- Muñoz-Fernández MA, Fernández MA, Fresno M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol.* 1992 Feb;22(2):301-7

- Muzio M. Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis *Int J Clin Lab Res.* 1998;28(3):141-7. Review
- Nakajima A, Azuma M. Costimulatory molecules in autoimmunity: role of CD28/CTLA4-CD80/CD86 *Nippon Rinsho.* 1997 Jun;55(6):1419-24.
- Nong YH, Remold-O'Donnell E, LeBien TW, Remold HG A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes *J Exp Med.* 1989 Jul 1;170(1):259-67.
- Nonomura C, Kikuchi J, Kiyokawa N, Ozaki H, Mitsunaga K, Ando H, Kanamori A, Kannagi R, Fujimoto J, Muroi K, Furukawa Y, Nakamura M. CD43, but not P-selectin glycoprotein ligand-1, functions as an E-selectin counter-receptor in human pre-B-cell leukemia NALL-1. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):790-9.
- Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J Immunol.* 1991 Oct 1;147(7):2240-7.
- Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF, DosReis GA. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *J Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1313-9.
- Onami TM, Harrington LE, Williams MA, Galvan M, Larsen CP, Pearson TC, Manjunath N, Baum LG, Pearce BD, Ahmed R Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):6022-31.
- Ostberg JR, Dragone LL, Driskell T, Moynihan JA, Phipps R, Barth RK, Frelinger JG Disregulated expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency *J Immunol.* 1996 Dec 1;157(11):4876-84.
- Pallant A, Eskenazi A, Mattei MG, Fournier RE, Carlsson SR, Fukuda M, Frelinger JG. Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Feb;86(4):1328-32.

- Pan J, Xia L, Yao L, McEver RP. Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and a variant activating transcription factor/cAMP response element. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):10068-77
- Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol.* 1997 Jun 27;60(1):49-54.
- Pedraza-Alva G, Mérida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J Biol Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27564-8.
- Planelles L, Thomas MC, Marañón C, Morell M, López MC. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol.* 2003 Jan;131(1):41-7.
- Previato, J.O; Andrade, A.F.B; Pessolani, M.C.V & Mendonça-Previato, L Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol. Biochem. Parasitol;* 1985 16: 85-96
- Previato, J.O; Andrade, A.F.B; Vermelho, A; Firmino, J.C. & Mendonça-Previato, L Evidence for *N*-glycolylneuraminic acid incorporation by *Trypanosoma cruzi* from infected animal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 1990 85: 38
- Priatel JJ, Chui D, Hiraoka N, Simmons CJ, Richardson KB, Page DM, Fukuda M, Varki NM, Marth JD. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity.* 2000 Mar;12(3):273-83.
- Ramírez-Pliego O, Escobar-Zárate DL, Rivera-Martínez GM, Cervantes-Badillo MG, Esquivel-Guadarrama FR, Rosas-Salgado G, Rosenstein Y, Santana MA. CD43 signals induce Type One lineage commitment of human CD4+ T cells. *BMC Immunol.* 2007 Nov 23;8:30

- Randhawa AK, Ziltener HJ, Merzaban JS, Stokes RW. CD43 is required for optimal growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and in mice. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):1805-12.
- Randhawa AK, Ziltener HJ, Stokes RW. CD43 controls the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* through the induction of TNF-alpha-mediated apoptosis. *Cell Microbiol*. 2008 Oct;10(10):2105-17.
- Reed SG. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chem Immunol*. 1998;70:124-43.
- Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today*. 2000 16: 62-67
- Remold-O'Donnell E, Zimmerman C, Kenney D, Rosen FS. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*. 1987 Jul;70(1):104-9.
- Revy P, Sospedra M, Barbour B, Trautmann A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol*. 2001 Oct;2(10):925-31.
- Rodrigues, M.M; Ribeirão, M; Pereira-Chioccola, V; Renia, L & Costa, F 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*. 1999 67: 3855-3863
- Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond *Annu Rev Immunol*. 2004;22:129-56.
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE, Burakoff SJ. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature*. 1991 Nov 21;354(6350):233-5
- Rossi MA Pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis. *Sao Paulo Med J*. 1995 Mar-Apr;113(2):750-6
- Rossi MA, Ramos SG. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. *Am Heart J*. 1996 Jul;132(1 Pt 1):207-10.

- Rottenberg ME, Riarte A, Sporrang L, Altchek J, Petray P, Ruiz AM, Wigzell H, Orn A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett.* 1995 Feb;45(1-2):53-60.
- Roumier A, Olivo-Marin JC, Arpin M, Michel F, Martin M, Mangeat P, Acuto O, Dautry-Varsat A, Alcover A. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation *Immunity.* 2001 Nov;15(5):715-28.
- Russo M, Starobinas N, Marcondes MC, Minoprio P, Honteyberie-Joskowicz M. The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Immunol Lett.* 1996 Mar;49(3):163-8.
- Sallusto F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica.* 1999 Jun;84 Suppl EHA-4:28-31.
- Sánchez-Mateos P, Campanero MR, del Pozo MA, Sánchez-Madrid F. Regulatory role of CD43 leukosialin on integrin-mediated T-cell adhesion to endothelial and extracellular matrix ligands and its polar redistribution to a cellular uropod. *Blood.* 1995 Sep 15;86(6):2228-39.
- Santana MA, Esquivel-Guadarrama F. Cell biology of T cell activation and differentiation *Int Rev Cytol.* 2006;250:217-74.
- Santana MA, Pedraza-Alva G, Olivares-Zavaleta N, Madrid-Marina V, Horejsi V, Burakoff SJ, Rosenstein Y. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31460-8.
- Santana MA, Rosenstein Y. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. *J Cell Physiol.* 2003 Jun;195(3):392-401.
- Saraiva, V.B; Gibaldi, D; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L; Bozza, M.T; Freire-De-Lima, C.G & Heise N. Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2002 46: 3472-3477

- Savage ND, Kimzey SL, Bromley SK, Johnson KG, Dustin ML, Green JM. Polar redistribution of the sialoglycoprotein CD43: implications for T cell function J Immunol. 2002 Apr 15;168(8):3740-6.
- Schenkman, S; Jiang, M.S; Hart, G.W & Nussenzweig V. A novel cell surface *trans*-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*. 1991 28: 1117-1125
- Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. J Immunol. 1990 Apr 1;144(7):2771-80
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis AE 3rd, Bruns GA, Rosen FS, Carroll MC, Whitehead AS. Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(8):2819-23. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Jun;86(12):4689.
- Shigeta A, Matsumoto M, Tedder TF, Lowe JB, Miyasaka M, Hirata T. An L-selectin ligand distinct from P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and promotes neutrophil rolling in inflammation Blood. 2008 Dec 15;112(13):4915-23. Epub 2008 Sep 25
- Shimizu Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. FASEB J. 1991 Jun;5(9):2292-9.
- Sikut R, Nilsson O, Baeckström D, Hansson GC. Colon adenoma and cancer cells aberrantly express the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Sep 18;238(2):612-6.
- Soeiro, M.N. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol*. 2006;133:75-9.
- Soong L, Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi* infection suppresses nuclear factors that bind to specific sites on the interleukin-2 enhancer. Eur J Immunol. 1994 Jan;24(1):16-23.

- Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med*. 2003 May 19;197(10):1355-63
- Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, DiPaolo RJ, Klein JR, Bluestone JA, Thompson CB. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J Exp Med*. 1995 Jul 1;182(1):139-46
- Sperling AI, Sedy JR, Manjunath N, Kupfer A, Ardman B, Burkhardt JK. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6459-62.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):301-14.
- Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*. 1995 Feb 16;373(6515):615-20.
- Stockton BM, Cheng G, Manjunath N, Ardman B, von Andrian UH. Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity*. 1998 Mar;8(3):373-81.
- Stokes RW, Haidl ID, Jefferies WA, Speert DP. Mycobacteria-macrophage interactions. Macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. *J Immunol*. 1993 Dec 15;151(12):7067-76.
- Stross WP, Warnke RA, Flavell DJ, Flavell SU, Simmons D, Gatter KC, Mason DY. Molecule detected in formalin fixed tissue by antibodies MT1, DF-T1, and L60 (Leu-22) corresponds to CD43 antigen. *J Clin Pathol*. 1989 Sep;42(9):953-61.
- Sun J, Tarleton RL. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Feb;48(2):161-9.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-58. Epub 2001 Dec 19. Review.

- Takai Y, Kitano K, Terawaki S, Maesaki R, Hakoshima T Structural basis of the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD43 and its binding to ERM proteins. *Mol Biol.* 2008 Sep 5;381(3):634-44.
- Tanowitz HB, Burns ER, Sinha AK, Kahn NN, Morris SA, Factor SM, Hatcher VB, Bilezikian JP, Baum SG, Wittner M. Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas' disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Sep;43(3):274-81
- Tanowitz HB, Gumprecht JP, Spurr D, Calderon TM, Ventura MC, Raventos-Suarez C, Kellie S, Factor SM, Hatcher VB, Wittner M Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis.* 1992 Sep;166(3):598-603.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M, Glimcher LH. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol.* 1996 Jan;8(1):13-22.
- Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today.* 1999 Mar;15(3):94-9.
- Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol.* 1988 Apr 15;140(8):2769-73.
- Tarleton, R. L. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological Reviews.* 2004 201: 304-317
- Tarleton, R.L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasitol. Today.* 1995 11: 7-9
- Tarleton, R.L., Reithinger, R., Urbina, J.A., Kitron, U., Gürtler, R.E. The challenges of Chagas Disease- grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med.* 2007 4:332.
- Tarleton, R.L; Koller, B.H; Latour, A & Postan, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature.* 1992 26: 338-340

- Tarleton, R.L; Sun, J; Zhang, L & Postan, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun*. 1994 62: 1820–1829
- Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*. 2002 Jun;18(6):262-5
- Todeschini AR, Girard MF, Wieruszeski JM, Nunes MP, DosReis GA, Mendonca-Previato L, Previato JO. *trans*-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds host T-lymphocytes in a lectin manner. *J Biol Chem*. 2002 Nov 29;277(48):45962-8.
- Todeschini, A.R; Nunes, M.P; Pires, R.S; Lopes, M.F; Previato, J.O; Mendonca-Previato, L & DosReis, G.A. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal *trans*-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J. Immunol*. 2002 168: 5192-5198
- Tyler K.M & Engman DM The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol*. 2001 1: 472-481
- Tzelepis, F; de Alencar, B.C; Penido, M.L; Claser, C; Machado, A.V; Bruna-Romero, O; Gazzinelli, R.T & Rodrigues, M.M. Infection with *Trypanosoma cruzi* restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. *J. Immunol*. 2008 1: 1737-1748
- Tzelepis, F; de Alencar, B.C; Penido, M.L; Gazzinelli, R.T; Persechini, P.M & Rodrigues, M.M. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect. Immun*. 2006 74: 2477-2481
- Tzelepis, F; Persechini, P.M & Rodrigues, M.M. 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*. 2007 25: 393
- Umekita LF, Mota I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz J Med Biol Res*. 2000 Mar;33(3):253-8.
- Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F, Vray B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and

prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun.* 1999 Aug;67(8):4033-40.

Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.* 2007 Sep;87(9):851-7.

Weber S, Ruh B, Dippel E, Czarnetzki BM Monoclonal antibodies to leucosialin (CD43) induce homotypic aggregation of the human mast cell line HMC-1: characterization of leucosialin on HMC-1 cells. *Immunology.* 1994 Aug;82(4):638-44

Wiernik PH. Plasma cell myeloma and leukemia. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 2003;21:365-97

Wikén M, Björck P, Axelsson B, Perlmann P. Induction of CD43 expression during activation and terminal differentiation of human B cells. *Scand J Immunol.* 1988 Oct;28(4):457-64.

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

Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA, Wardlaw AJ. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow *Blood.* 2000 May 15;95(10):3146-52.

Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY, Kubes P. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *J Exp Med.* 1998 Dec 7;188(11):2181-6

Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(7):939-50.

- Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3168-75
- Yago T, Wu J, Wey CD, Klopocki AG, Zhu C, McEver RP. Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear. *J Cell Biol*. 2004 Sep 13;166(6):913-23. Erratum in: *J Cell Biol*. 2005 Mar 14;168(6):975
- Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med*. 1999 Dec 20;190(12):1769-82.
- Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med*. 1996 Jul 1;184(1):81-92
- Yoshida, N (2008). *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol. Int*. 57: 105-109
- Zambrano-Villa, S; Rosales-Borjas, D; Carrero J.C & Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends. Parasitol*. 2002 18: 272-278
- Zanardo RC, Bonder CS, Hwang JM, Andonegui G, Liu L, Vestweber D, Zbytnuik L, Kubes P. A down-regulatable E-selectin ligand is functionally important for PSGL-1-independent leukocyte-endothelial cell interactions. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3766-73. Epub 2004 Aug 10.

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](#)