

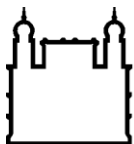
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária
Mestrado

**Busca de biomarcadores de infecção aguda e crônica
pelo *Trypanosoma cruzi*: perfil de N-glicanas em proteínas
séricas e glicofenótipos em leucócitos**

LEONARDO ALEXANDRE DE SOUZA RUIVO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LEONARDO ALEXANDRE DE SOUZA RUIVO

Busca de biomarcadores de infecção aguda e crônica pelo *Trypanosoma cruzi*: perfil de N-glicanas em proteínas séricas e glicofenótipos em leucócitos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Biologia Parasitária

Orientadora: Dr^a Joseli Lannes-Vieira

Colaboradores: Dr^a Lucia Previato e Dr José Oswaldo Previato

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R934 Ruivo, Leonardo Alexandre de Souza

Busca de biomarcadores de infecção aguda e crônica pelo
Trypanosoma cruzi: perfil de N-glicanas em proteínas séricas e
glicofenótipos em leucócitos / Leonardo Alexandre de Souza Ruivo. – Rio
de Janeiro, 2016.

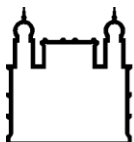
xiii, 87 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 76-87

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Glicoconjugados. 3. Linfócitos TCD8-
Positivos. 4. *Peanut agglutinin*. 5. Perforina. 6. Interferon-gama. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Esta dissertação intitulada:

**Busca de biomarcadores de infecção aguda e crônica pelo
Trypanosoma cruzi: perfil de N-glicanas em proteínas séricas e
glicofenótipos em leucócitos**

Apresentada por

LEONARDO ALEXANDRE DE SOUZA RUIVO

ORIENTADORA: Dr^a Joseli Lannes-Vieira

Colaboradores: Dr^a Lucia Previato e Dr José Osvaldo Previato

Aprovada em: 28 / 01 / 2016

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr^a Mariana Waghbi (Presidente)

Prof. Dr. Leonardo Freire de Lima (UFRJ - Membro)

Prof. Dr^a Andrea Alice da Silva (UFF - Membro)

Prof. Dr^a Gladys Corrêa da Silva (Fiocruz - Suplente)

Prof. Dr. Alexandre Morrot (UFRJ - Suplente)

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2016

Dedico essa dissertação à mulher que nem por um segundo duvidou que eu chegaria lá, minha mãe, meu eterno anjo.

“...you may say I’m a dreamer but I’m not the only one!”

Imagine

Jhon Lennon

AGRADECIMENTOS

Agradeço a forças e situações que estão fora do nosso controle, sejam elas Deus, o Universo ou qualquer outra forma que me permitiu hoje aqui estar.

Agradeço aos meus pais, que por vezes, mesmo sem entender bem os caminhos que resolvi percorrer, me apoiaram em tudo, em especial minha mãe que sempre esteve e sei que sempre estará ao meu lado.

Agradeço a todos os amigos que passaram, foram embora e os que ficaram e fizeram parte dessa história: Kátia, Ana e Roberta amigas da infância e que vou levar para toda a vida.

A quatro amigos mais que especiais, pois fizeram parte atuante me apoiando e estando perto mesmo antes de toda essa jornada começar: Bárbara minha amiga e irmã, Eduardo e Ana Paula a família que me adotou e fez os momentos pesados se tornarem mais leves e por último à Lílian Sant'Ana por me fazer acreditar que nunca é tarde.

Agradeço aos funcionários, amigos e colegas dos diversos pavilhões por onde passei nesses dois anos: Joseane e João pela amizade e apoio administrativo, Lucilene por manter o ambiente organizado, pelas risadas, conselhos e lanches (quando a fome apertou).

Agradeço aos amigos dos dois laboratórios por onde passei, na UFRJ: os Leonardos (Freire de Lima e Fonseca) pelas conversas científicas e paciência em me ensinar assuntos novos, Keli, Priscila, Lana, Vilma, Elisangela, Thales e Diogo, todos sempre disponíveis e dispostos a ajudar.

Aos queridos amigos do LBI: Rafael, Daniel e Rhaissa pela amizade e apoio, Isabela e Glaucia por além da amizade, terem feito parte do meu crescimento e formação científica, minha eterna gratidão.

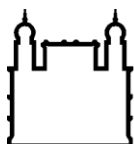
À professora Vívian Rumjanek e Eduardo Salustiano, primeiras pessoas com quem tive contato no mundo acadêmico após a graduação e que muito me apoiaram a seguir em frente.

À professora Andrea Alice, pela paciência e dedicação em me ensinar e me acompanhar em uma nova técnica para responder um dos meus objetivos.

Aos professores Lucia e José Osvaldo Previato, por terem aberto as portas do seu laboratório e dado o ponta pé inicial na minha carreira científica e por terem acreditado que eu poderia chegar até aqui.

Por último com respeito e admiração, agradeço à minha orientadora a Dr^a Joseli Lannes, por aceitar o desafio de orientar e acompanhar alguém que sem nenhuma experiência no meio científico cresceu gradativamente nesses últimos dois anos graças as horas de dedicação que ela disponibilizou em me acompanhar.

Muito obrigado a todos!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

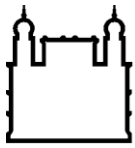
**Busca de biomarcadores de infecção aguda e crônica pelo *Trypanosoma cruzi*:
perfil de N-glicanas em proteínas séricas e glicofenótipos em leucócitos**

LEONARDO ALEXANDRE DE SOUZA RUIVO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Alterações no perfil de glicosilação de proteínas, células e tecidos têm sido utilizadas como marcadores biológicos para processos fisiológicos e patológicos. Glicoconjugados contendo o ácido siálico (Neu5Ac) estão envolvidas em interações celulares e parasito-hospedeiro, tráfego de linfócitos e regulação do sistema imune. O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC), expressa em sua superfície e libera no plasma do hospedeiro, uma enzima restrita ao gênero *Trypanosoma*, a *trans*-sialidase (TS). Esta é capaz de transferir Neu5Ac de moléculas doadoras e realocá-las em moléculas na superfície do parasito ou sialilar glicoproteínas de células do hospedeiro. A molécula CD43 é um importante receptor de Neu5Ac em células T e um provável sítio de ação da TS. Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, as células T CD8⁺ apresentam, majoritariamente, perfis segregados (i) perforina⁺ (Pfn⁺), com ação citotóxica, ou (ii) interferon-gama⁺ (IFNγ⁺), com perfil inflamatório. Estas células estão diferencialmente compartmentalizadas e atuam de forma antagônica, enquanto as Pfn⁺ se acumulam na inflamação cardíaca e contribuem para a injúria tecidual, as IFNγ⁺ estão majoritariamente na periferia (sangue e baço) e atuam de forma benéfica. Neste trabalho, propomos que na infecção pelo *T. cruzi* há alterações de glicofenótipos em proteínas séricas e subpopulações de linfócitos T CD8⁺ funcionalmente segregadas. Camundongos C57BL/6 foram infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* e analisados clinicamente. O glicofenótipo de proteínas séricas foi analisado por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e o glicofenótipo de tecido cardíaco e de células do baço foi analisado usando lectinas por histoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. Não detectamos modificação no perfil glicosídico em proteínas séricas em animais infectados. Observamos, no tecido cardíaco, reduzida marcação para a lectina *Peanut agglutinin* (PNA), aumento para *Sambucus nigra* (SNA) e não alteração para *Maackia amurensis* (MAL) em células musculares e inflamatórias. Notamos nas fases aguda (42 dpi) e crônica (120 dpi) aumento na frequência de células PNA⁺ nas células T CD8⁺CD43⁺ e CD4⁺CD43⁺, redução no percentual de células SNA⁺ nas células T CD8⁺ e CD4⁺ e diminuição na proporção de células MAL⁺ nas células T CD4⁺ e CD8⁺CD4⁺. Células T CD8⁺ totais ou CD8⁺PNA⁺ apresentaram perfis semelhantes de ativação (CD44⁺CD62L⁻), migração (LFA-1⁺CCR5⁺ ou LFA-1⁺CCR1⁺) e funcionalidade (Pfn⁺, Pfn⁺IFNγ⁺ ou IFNγ⁺). Em 120 dpi, detectou-se enriquecimento de células CD8⁺PNA⁺IFNγ⁺ no baço. Assim, durante a DC experimental, células T CD8⁺PNA⁺ apresentam-se ativadas e com potencial de migrar e exercer atividade inflamatória (IFNγ⁺), contudo estas não foram detectadas em tecido cardíaco. Resta-nos esclarecer se estas células não migram para este tecido, acumulando-se na periferia, ou se ao entrarem no tecido cardíaco têm seu glicofenótipo alterado ou morrem de modo seletivo. Embora nossos achados não permitam a identificação de biomarcadores de natureza glicosídica de progressão e/ou gravidade da DC, abrem perspectivas para explorar outros modelos experimentais de infecção e para estudos sobre a compartmentalização de células fenotipicamente distintas e funcionalmente relacionadas à proteção contra a injúria cardíaca na infecção pelo *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Searching for biomarkers of acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infection: N-glycan profile of serum proteins and glyco phenotypes of leukocytes

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

LEONARDO ALEXANDRE DE SOUZA RUIVO

Changes in glycosylation profile of proteins, cells and tissues have been used as biological markers of physiological and pathological processes. Glicoconjugates containing sialic acid (Neu5Ac) are involved in cell and host-parasite interactions, lymphocyte traffic and regulation of the immune system. *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (CD), expresses on the surface and releases in the host plasma, a restricted enzyme to the genus *Trypanosoma*, the *trans*-sialidase (TS). This enzyme transfers Neu5Ac from donor molecules and relocates them on parasite surface molecules or sialylates glycoproteins of the host cells. The CD43 molecule is a major acceptor of Neu5Ac on T cells and a target site for TS. In experimental *T. cruzi* infection, CD8⁺ T cells have, mostly, segregated profiles (i) perforin⁺ (Pfn⁺) with cytotoxic action, or (ii) interferon-gamma⁺ (IFNγ⁺), with inflammatory profile. These cells are differentially compartmentalized and play antagonistic roles, while the Pfn⁺ cells accumulate in cardiac inflammation and contribute to tissue injury, the IFNγ⁺ are, mostly, at the periphery (blood and spleen) and play a beneficial role. In the present study, we propose that in *T. cruzi* infection there are glyco phenotype changes in serum proteins and subpopulations of functionally segregated CD8⁺ T lymphocytes. C57BL/6 mice were infected with the Colombian strain of *T. cruzi* and analyzed for clinical changes. The glyco phenotype of serum proteins was analyzed by mass spectrometry (MALDI-TOF) and glyco phenotypes of the cardiac tissue and splenic cells were analyzed using a lectin-based immunohistochemistry and flow cytometry, respectively. In infected mice, we did not detect changes in glycoside profile of serum proteins. In the cardiac tissue, we observed reduced staining for the lectin *Peanut agglutinin* (PNA), increased for *Sambucus nigra* (SNA) and no alterations for *Maackia amurensis* (MAL) in muscle and inflammatory cells. In the acute (42 dpi) and chronic (120 dpi) phases, we noticed increased frequency of PNA⁺ cells among CD8⁺CD43⁺ and CD4⁺CD43⁺ T cells, reduced percentage of SNA⁺ cells among CD8⁺ and CD4⁺ T cells and decreased proportion of MAL⁺ cells among CD4⁺ and CD8⁺CD4⁺ T cells. Total and PNA⁺ CD8⁺ T cells showed similar profiles of activation (CD44⁺CD62L⁻), migration (LFA-1⁺CCR5⁺ cells or LFA-1⁺CCR1⁺) and functionality (Pfn⁺, Pfn⁺IFNγ⁺ or IFNγ⁺). At 120 dpi, there is an enrichment in IFNγ⁺ cells among splenic CD8⁺PNA⁺. Thus, in experimental CD PNA⁺ CD8⁺T cells are activated and potentially able to migrate towards heart tissue and show inflammatory profile (IFNγ⁺); however, PNA⁺ cells were not detected in this tissue. It remains to be clarified whether these cells do not migrate to this tissue, accumulating in peripheral tissues, or whether they enter the cardiac tissue but have their glyco phenotype modified or selectively dye. Although, our finds do not allow identifying glycosidic biomarkers of progression and/or severity of CD, they open new pathways to be explored using other experimental models of infection and studying the compartmentalization of phenotypically and functionally distinct cells associated with detrimental or protective role in heart injury in *T. cruzi* infection.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
BAV1/2	bloqueio átrio-ventricular de primeiro/segundo grau
Bz	Benznidazol
CAM	Molécula de adesão celular
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
CCR	Receptor de quimiocinas do tipo CC
CD43	Sialoforina ou leucosialina; principal sialoglicoproteína na superfície de linfócitos T, monócitos, granulócitos e alguns linfócitos B
CD62L	L- selectina
CK-MB	Isoenzima MB da creatina quinase
DC	Doença de Chagas
dpi	Dias pós-infecção
ECG	Eletrocardiograma
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FN	Fibronectina
GBPs	Proteínas que se ligam a glicanas
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular do tipo 1 (CD54)
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFN γ	Interferon- γ
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL	Interleucina
LFA-1	Antígeno funcional do tipo 1 presente em leucócitos (CD11a/CD18; α L β 2); ligante de ICAM-1
MAL	Lectina de <i>Maackia amurensis</i> ; do grupo das lectinas se liga a Neu5Ac/Gc α 2,3Gal β 1,4Glc(NAc)
Met-RANTES	Antagonista de CCL5/RANTES, RANTES humano recombinante com uma metionina na porção amino-terminal
OMS	Organização mundial de saúde
Pfn	Proteína formadora de poro (perforina)
PNA	Lectina <i>Peanut agglutinin de Arachis hypogaea</i> ; se liga a Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr (T-Antigen)
PTX	Pentoxifilina
SNA	Lectina de <i>Sambucus nigra</i> ; se liga a Neu5Ac α 2-6Gal(NAc)-R
TCR	Receptor de antígeno de célula T
TFA	Ácido trifluoracético
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor de TNF do tipo 1
VCAM-1	Molécula de adesão celular expressa pelo endotélio vascular (CD106); ligante de VLA-4
VLA-4	Antígeno de aparecimento tardio do tipo 4; α 4 β 1

Lista de Figuras

Figura 2.1: Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> .	4
Figura 2.2: Esquema simplificado das etapas de adição e subtração de monossacarídeos	11
Figura 6.1: Curvas de parasitemia e sobrevivência de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	28
Figura 6.2: Curvas de variação de peso e temperatura de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	29
Figura 6.3: Alterações elétricas em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	30
Figura 6.4: Espectro de N-glicanas de proteínas séricas de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	32-35
Figura 6.5: Cortes histológicos e marcação de fibronectina em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	37
Figura 6.6: Cortes histológicos e marcação para ligantes de lectinas em baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	38
Figura 6.7: Cortes histológicos e marcação da lectina PNA em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	39
Figura 6.8: Cortes histológicos e marcação da lectina SNA em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	40
Figura 6.9: Cortes histológicos e marcação da lectina MAL em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	41
Figura 6.10: Análise quantitativa da marcação de lectinas em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	42
Figura 6.11: Sequência representativa da análise de citometria de fluxo de amostras de células de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> .	44
Figura 6.12: Frequência de células T em baço de camundongos da linhagem	45

C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*.

- Figura 6.13:** Expressão de ligantes de lectinas em células de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 47
- Figura 6.14:** Padrão representativo da expressão de ligantes de lectinas em subpopulações de células T de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 49
- Figura 6.15:** Frequência de células expressando ligantes de lectinas em subpopulações de células T de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 50
- Figura 6.16:** Expressão de CD43 e ligantes de PNA em células T de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 52
- Figura 6.17:** Expressão de CD44 e CD62L em células CD8⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 54
- Figura 6.18:** Expressão de CD44 e CD62L em células CD8⁺PNA⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 55
- Figura 6.19:** Expressão de LFA-1 e CCR5/CCR1 em células CD8⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 57
- Figura 6.20:** Expressão de LFA-1 e CCR5/CCR1 em células CD8⁺PNA⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 58
- Figura 6.21:** Sequência representativa da obtenção de *gates* para análise do padrão de funcionalidade de células CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 60
- Figura 6.22:** Frequência de células CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺ expressando perfil funcional Pfn⁺, IFN γ ⁺Pfn⁺ ou IFN γ ⁺ em baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. 61

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. DOENÇA DE CHAGAS: HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA	3
2.2. PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS	5
2.2.1. <i>Cardiomiopatia chagásica crônica</i>	6
2.2.2. <i>Ativação e migração celular na infecção chagásica</i>	6
2.2.3. <i>Infiltrado inflamatório no tecido cardíaco: composição e papel funcional</i>	8
2.3. GLICOBIOLOGIA	10
2.3.1. <i>Glicobiologia: histórico e evolução</i>	10
2.3.2. <i>Glicobiologia: da fisiologia a alterações patológicas</i>	11
2.3.3. <i>Lectinas como marcadores biológicos em diversas patologias</i>	12
2.3.4. <i>Ácido siálico, Trypanosoma cruzi e trans-sialidase</i>	14
2.3.5. <i>Alterações glicosídicas na doença de Chagas</i>	16
3. HIPÓTESE	17
4. OBJETIVO GERAL	18
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1. ANIMAIS	19
5.2. INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELA CEPA COLOMBIANA DO <i>T. CRUZI</i>	19
5.3. CURVAS DE PARASITEMIA, MORTALIDADE E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO	20
5.4. OBTENÇÃO DE SOROS E PREPAROS DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE PERFIL DE N-GLICANAS EM PROTEÍNAS SÉRICAS	21
5.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF	21
5.5.1. <i>Extração de N-glicanas</i>	21
5.5.2. <i>Permetilação</i>	22
5.6. IMUNOISTOQUÍMICA (IHS)	23
5.7. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES ISOLADAS DO BAÇO	24
5.8. MARCAÇÃO EXTRA E INTRACELULAR DE ESPLÊNOCITOS POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS) ...	25
6. RESULTADOS	27
6.1. PARASITEMIA E SOBREVIVÊNCIA	27
6.2. PARÂMETROS CLÍNICOS: PESO, TEMPERATURA E ALTERAÇÕES ELÉTRICAS	27
6.3. PERFIL DE N-GLICANAS EM PROTEÍNAS SÉRICAS ATRAVÉS DO ENSAIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF	31

6.4.	PERFIL DE LIGAÇÃO DE LECTINAS NO TECIDO CARDÍACO NA INFECÇÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	36
6.5.	FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T ESPLÊNICAS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	43
6.6.	FREQUÊNCIA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS QUE EXPRESSAM LIGANTES PARA LECTINAS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	46
6.7.	PERFIL DE GLICOSILAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ E CD4 ⁺ DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> REVELADOS PELA LIGAÇÃO DAS LECTINAS PNA, SNA E MAL	48
6.8.	EXPRESSÃO DE CD43 E LIGANTES PARA LECTINA PNA EM LINFÓCITOS T DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	51
6.9.	PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ QUE EXPRESSAM LIGANTES PARA A LECTINA PNA DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	53
6.10.	PERFIL DE MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ QUE EXPRESSAM LIGANTES PARA A LECTINA PNA DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	56
6.11.	PERFIL FUNCIONAL DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ QUE EXPRESSAM LIGANTES PARA A LECTINA PNA DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	59
7.	DISCUSSÃO	62
8.	CONCLUSÕES	74
9.	PERSPECTIVAS	75
10.	REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Glicoconjugados são expressos por células de todos os organismos vivos até hoje estudados. Desde a sua descoberta, estas moléculas têm sido alvo de intensa pesquisa a respeito de sua distribuição, bioquímica e papel biológico (Varki, 2011). Os carboidratos estão presentes em bactérias e arqueobactérias, são secretados por células eucarióticas e participam de diversos processos, tais como: interação parasito/hospedeiro, migração, reconhecimento celular, além de modulação do sistema imune (Kannagi, 2002; Vimr & Lichtensteiger, 2002; Pappu & Shrikant, 2004; Varki, 2007). A estrutura química dos carboidratos é mais variável e diversificada do que a das proteínas e ácidos nucleicos (Varki, 2011) e modificações em sua composição podem indicar presença de anomalias fisiológicas como neoplasias (Reis *et al.*, 2010) e doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide (Mastrangelo *et al.*, 2015). Dessa forma, as alterações na composição dos carboidratos têm sido utilizadas como biomarcadores e ferramentas no diagnóstico, identificando alterações dos perfis de glicosilação em proteínas séricas e superfícies celulares, auxiliando o controle de diversas patologias (Wagner & Pesnot, 2010). Desde a sua formação no retículo endoplasmático até sua finalização e empacotamento no complexo de Golgi, glicoconjugados passam por várias etapas de adição e subtração de monossacarídeos em sua composição. O ácido siálico (Neu5Ac) é encontrado exclusivamente na posição terminal de glicoconjugados. Moléculas oligossacarídicas contendo Neu5Ac estão envolvidas em interações específicas do tipo ligante-receptor (Previato *et al.*, 1985). Neu5Ac está envolvido em diversos processos biológicos como o processo de seleção positiva de linfócitos T no timo (Amado *et al.*, 2004), assim como a maturação, ativação e apoptose celular (Bi & Baum, 2009; Tatsuta *et al.*, 2013). Patologias, como cânceres, já são descritas por apresentarem modificações na presença ou ausência deste açúcar na posição terminal dos glicoconjugados (Crocì *et al.*, 2014).

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC), expressa em sua superfície e libera no plasma do hospedeiro uma enzima unicamente encontrada no gênero *Trypanosoma*, a *trans*-sialidase (TS) (Schenkman *et al.*, 1991). Esta enzima é capaz de promover a retirada do Neu5Ac da posição terminal de glicoconjugados e realocá-lo em sua própria superfície ou na superfície das células de hospedeiros (Freire-De-Lima *et al.*, 2010).

A fase aguda da DC é caracterizada por parasitemia patente com o consequente aumento da liberação de TS no plasma sanguíneo. O aumento nos níveis plasmáticos de TS

pode promover um desbalanço fisiológico com realocação de Neu5Ac presente em proteínas plasmáticas para células do sistema imunológico, como linfócitos T. Essa modificação no perfil de sialilação de glicoproteínas pode modular a invasão da célula hospedeira e/ou a resposta das células do sistema imune na fase aguda da DC (Freire-De-Lima *et al.*, 2010).

Com o desenvolvimento da resposta imunológica há o controle da parasitemia e do parasitismo e os indivíduos entram na fase crônica da DC que pode perdurar por anos. Cerca de 60-70% dos portadores da DC permanecem na forma indeterminada, enquanto 30-40% dos indivíduos infectados desenvolvem as formas clínicas sintomáticas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010). Nos portadores da forma cardíaca, é proposto que a persistência do parasito e a resposta imune na fase crônica da infecção determinem a presença de um ambiente inflamatório causando danos ao tecido (Pereira *et al.*, 2014 a). Este ambiente inflamatório é composto principalmente por células mononucleares, em sua maioria linfócitos T CD8⁺ (Higuchi Mde *et al.*, 1993; Reis Machado *et al.*, 2014). Na cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) experimental foi demonstrado que linfócitos T CD8⁺ expressam um perfil funcional segregado e compartimentalizado, encontrando-se majoritariamente células que reconhecem antígenos do *T. cruzi* e que expressam interferon-gama (IFN γ ⁺) em sangue periférico e células que expressam perforina (Pfn⁺) em tecido cardíaco (Silverio *et al.*, 2012). Neste estudo, os autores sugerem que essas populações segregadas têm papéis antagônicos, sendo células T CD8⁺IFN γ ⁺ protetoras e células T CD8⁺Pfn⁺ associadas à lesão de cardiomiócitos e alterações elétricas.

Em conjunto, os estudos acima sugerem que na infecção pelo *T. cruzi* há modificação no glicofenótipo de proteínas séricas e no perfil de sialilação de glicoproteínas em linfócitos, que pode estar relacionado a sua capacidade funcional. Dessa forma, as alterações de glicofenótipos causadas pela presença do parasito e pela ação da TS podem servir como marcadores biológicos da DC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doença de Chagas: Histórico e Epidemiologia

Desde a sua descoberta por Carlos Chagas, a DC tem sido alvo de intensas pesquisas e estudos. Como um marco na história da ciência, Carlos Chagas foi o primeiro, e único, cientista até hoje a descrever o agente etiológico, hospedeiros invertebrado e vertebrado e a desvendar o ciclo de vida e as formas de transmissão desta patologia (Chagas, 1909; Junqueira *et al.*, 2010). Mais de cem anos após a descrição da DC, esta continua atual e relevante, pois atinge cerca de 6 a 7 milhões de pessoas ao redor do mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2015). Movimentos migratórios, facilidade de deslocação e globalização aumentam os números de portadores da DC e casos diagnosticados em áreas não endêmicas (Junqueira *et al.*, 2010; Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010).

A DC tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae, capaz de infectar diversas espécies animais vertebrados incluindo o homem (Junqueira *et al.*, 2010). O *T. cruzi* é transmitido classicamente por um inseto hemíptera, da família Reduviidae que possui diversas espécies, entre as mais comuns estão o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Junqueira *et al.*, 2010). Condições de vida precária, moradias inadequadas e proximidade de casas ao habitat do inseto favorecem a inclusão do homem no ciclo de vida deste protozoário (Hotez *et al.*, 2013).

O *T. cruzi* possui um ciclo complexo envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados (Chagas, 1909). Ao ser sugado pelo inseto vetor as formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* provenientes do sangue do hospedeiro vertebrado, se diferenciam na forma epimastigota na porção média do intestino do vetor, se multiplicando neste local por divisão binária. Já na porção do intestino posterior (ampola retal) pela ação do ambiente com formação de fezes e urina, o protozoário se diferencia na forma tripomastigota metacíclica. Após ou mesmo durante o repasto sanguíneo, o inseto libera juntamente com as fezes e urina a forma infectante do parasito, o tripomastigota metacíclico, que pode penetrar por solução de continuidade da epiderme no local da picada ou as mucosas do hospedeiro mamífero. Outras formas de infecção também já foram descritas como a via oral, vertical placentária, transfusão sanguínea e infecção acidental em laboratório (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010).

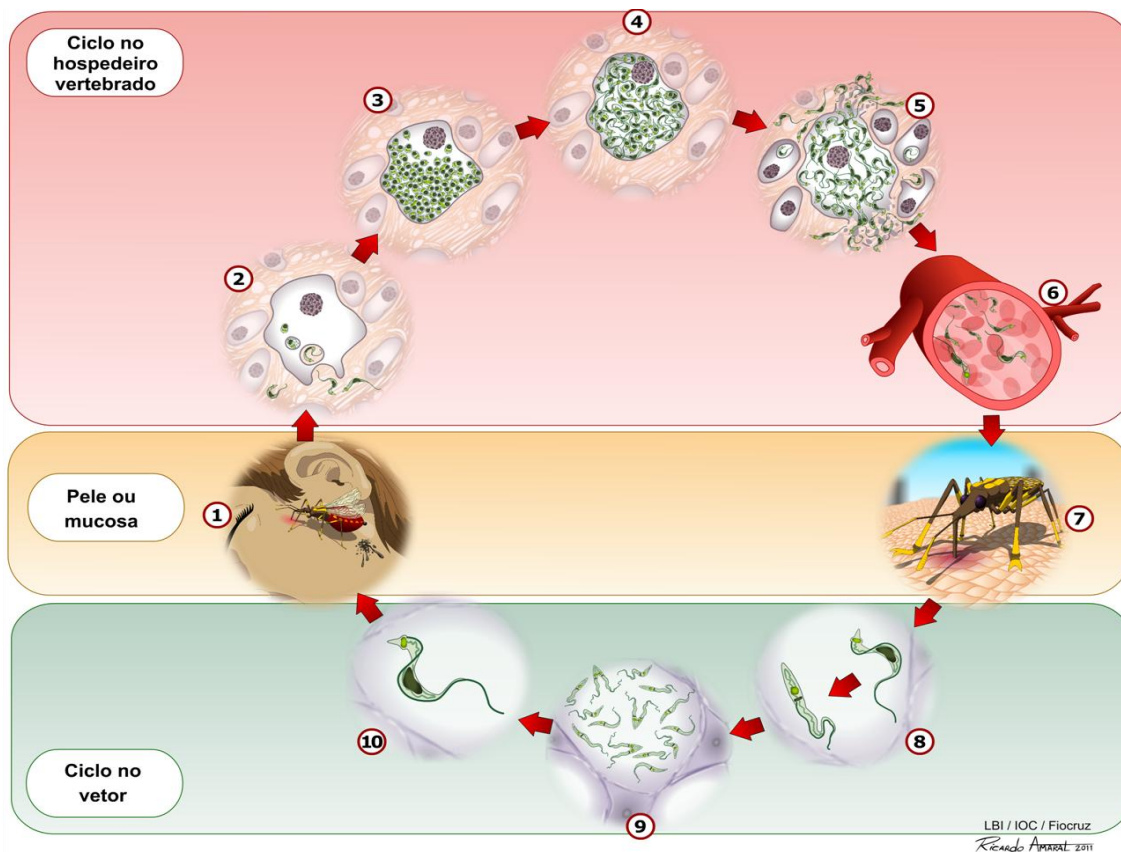


Figura 2.1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*. O *T. cruzi* é naturalmente transmitido pelo inseto hemíptero (barbeiro) da família Reduviidae. Durante o repasto sanguíneo, o inseto deposita na pele do hospedeiro vertebrado as fezes contendo a forma infectante do parasito (1). Em seguida, a forma tripomastigota metacíclica alcança o tecido subjacente e a corrente sanguínea do hospedeiro através da picada do inseto, pelo espalhamento até áreas lesionadas ou pelas mucosas. Nos hospedeiros mamíferos, formas tripomastigotas penetram em células locais (2) e se diferenciam em amastigotas; que são formas intracelulares e reprodutivas do parasita (3). Ocorre uma nova diferenciação para forma infectante tripomastigota sanguínea (4) causando o rompimento da célula e liberação dos parasitos na circulação (5). Estes podem invadir novas células, ficar no sangue (6) ou colonizar outros tecidos. Os hemípteros são infectados quando ingerem formas tripomastigotas durante o seu repasto sanguíneo (7). No hospedeiro invertebrado, as formas tripomastigotas ingeridas evoluem para as formas epimastigotas (8), as quais se multiplicam intensamente ao longo do tubo digestivo do inseto (9) e ao atingirem a ampola retal diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos (10), que são formas infectantes para o hospedeiro mamífero (Criação Coletiva do LBI/IOC).

Uma vez no sangue, o parasito pode atingir diversas partes do organismo infectando células, no interior das quais se diferenciará na forma amastigota, que se multiplica por divisão binária, diferenciando-se em tripomastigotas e rompendo a célula, podendo infectar outras células ou ganhar a corrente sanguínea e assim, ser adquirido pelo inseto vetor em um próximo repasto sanguíneo, fechando o ciclo (Fig. 2.1) (Junqueira *et al.*, 2010; Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010). Dados recentes indicando a predominância de novos casos por via

oral, vêm à tona após o controle da transmissão via penetração do parasito pelo local da picada ou por mucosa ocular, indicando a necessidade de novas estratégias para prevenir esta forma de contágio, como a informação sobre a necessidade de lavagem de frutas antes do consumo e pasteurização de alimentos, como sucos, assim como informação e educação da população em risco de contrair a infecção (Barbosa *et al.*, 2015).

2.2. Patogenia da doença de Chagas

Após duas ou três semanas da inoculação do *T. cruzi* por qualquer das vias de infecção, ocorre um aumento considerável do número de parasitos no sangue e tecidos do hospedeiro vertebrado. Com a parasitemia e o parasitismo intensos, há também ativação do sistema imune com aumento da presença de células T e B na corrente sanguínea (Junqueira *et al.*, 2010). Na fase aguda da DC, os sinais clínicos são brandos na maioria dos pacientes. Apesar de parasitemia patente ser a principal característica da DC aguda, além da esplenomegalia e o parasitismo intenso, somente 5-10% dos infectados apresentam miocardite e/ou meningoencefalite aguda (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010). Durante a fase aguda com a ativação da resposta imune (inata e adaptativa) do indivíduo infectado, a parasitemia e o parasitismo são controlados (Junqueira *et al.*, 2010). Cerca de 90% dos pacientes acabam por controlar a infecção passando longos períodos sem nenhuma manifestação clínica aparente. Destes, 60-70% nunca chegam a desenvolver sinais clínicos da DC (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010).

Após 10-30 anos do controle dos sintomas iniciais, 30-40% desenvolvem alguma das formas clínicas da DC: cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010). A forma digestiva é encontrada em 10-15% dos indivíduos e é caracterizada por apresentarem diminuição na secreção de enzimas digestivas, irregularidade nos movimentos peristálticos e absorção de nutrientes além de poder levar a hipertrofia do aparelho digestivo com megaesôfago e/ou megacólon (Junqueira *et al.*, 2010; Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010). Já a forma cardíaca da DC é caracterizada principalmente por CCC, com o aparecimento de infiltrados inflamatórios focais ou difusos no tecido cardíaco (Bilate & Cunha-Neto, 2008) que podem levar a arritmias, tromboembolismo e insuficiência cardíaca grave (Junqueira *et al.*, 2010; Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010; Rassi, Rassi & Marcondes De Rezende, 2012). É importante salientar que a forma cardíaca é a mais séria e frequente

manifestação da DC, incapacitando o indivíduo e podendo levar à morte (WHO, 2015).

2.2.1. Cardiomiopatia chagásica crônica

Após a fase aguda, os indivíduos recuperam-se, apresentando quadro aparentemente saudável. Entretanto, a miocardite focal ou difusa branda/moderada persiste, mantendo-se durante anos. A intensidade da CCC varia de branda para grave, com presença de miocardite, alterações elétricas (arritmias, bloqueios átrio-ventriculares), alterações estruturais (fibrose, redução de fração de ejeção do ventrículo esquerdo), levando à morte súbita ou à insuficiência cardíaca crônica (Junqueira *et al.*, 2010; Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010; Rassi, Rassi & Marcondes De Rezende, 2012). Modelos experimentais murinos e primatas não-humanos mimetizam aspectos da DC, incluindo alterações parasitológicas, imunológicas, elétricas e estruturais do coração, como a fibrose (Carvalho *et al.*, 2012; Silverio *et al.*, 2012). Embora em pacientes a presença do parasito não seja essencial para a formação de infiltrados inflamatórios, hoje é proposto que um desbalanço imunológico, principalmente de células T CD8⁺, e mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF) e IFN γ , sejam essenciais para a gravidade da doença (Higuchi Mde *et al.*, 2003; Lannes-Vieira *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014 a).

2.2.2. Ativação e migração celular na infecção chagásica

Durante processos infecciosos, na presença de injúria tecidual ou agente estranho, o acionamento de diversos componentes do sistema imune (inato e adquirido) são essenciais para a formação e o controle do processo inflamatório (Guerreiro, Santos-Costa & Azevedo-Pereira, 2011). Tecido lesado e células do sistema imune passam a expressar moléculas que indicam seu estado de inflamação e ativação que servem como quimioatraentes para o local da lesão (Guerreiro, Santos-Costa & Azevedo-Pereira, 2011). Na DC, apesar de essencial para o controle da infecção à presença constante do parasito, a permanência de células do sistema imune com alta produção de citocinas e quimiocinas são determinantes para a progressão da doença e o estabelecimento da forma cardíaca crônica (Dos Santos *et al.*, 2001; Teixeira, Gazzinelli & Silva, 2002; Lannes-Vieira *et al.*, 2009).

Em modelo experimental que mimetiza aspectos da CCC, a lesão causada no miocárdio

está associada não somente à persistência do parasito, mas também à ação de células inflamatórias no tecido cardíaco (Pereira *et al.*, 2014 a; Pereira *et al.*, 2015). Este infiltrado inflamatório é composto principalmente por células T CD8⁺, representando cerca de dois terços das células T encontradas nesse tecido em pacientes humanos (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997) ou em camundongos cronicamente infectados (Dos Santos *et al.*, 2001). Estudo analisando perfil de células T CD8⁺ em sangue de portadores da DC, com e sem comprometimento cardíaco, mostrou que a gravidade da doença está relacionada com o perfil de memória (CD27⁻CD28⁻) e a capacidade de respostas dessas células (Albareda *et al.*, 2006). Por outro lado, mostramos que a presença de células T CD8⁺ que expressam Pfn no tecido cardíaco de animais cronicamente infectados está associada à lesão de cardiomiócitos (Silverio *et al.*, 2010; Silverio *et al.*, 2012). Em conjunto, esses dados sugerem o papel crucial das células T CD8⁺ na gravidade da CCC.

Diversos dados sugerem que durante a infecção pelo *T. cruzi* um ambiente inflamatório no tecido cardíaco, com presença de IFN γ e TNF (Abel *et al.*, 2001; Kroll-Palhares *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2009), induz a expressão de quimiocinas por células do tecido lesionado (Marino *et al.*, 2004), molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1 no endotélios dos vasos sanguíneos (Michailowsky *et al.*, 2004) e produção de componentes da matriz extracelular, como a fibronectina (FN) (Dos Santos *et al.*, 2001). A infecção pelo *T. cruzi* também resulta em aumento da expressão de moléculas associadas à ativação e migração celular, como CD44 (Grisotto *et al.*, 2001), CCR5 (Marino *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2009) e antígeno 1 associado à função leucocitária (LFA)-1 (Dos Santos *et al.*, 2001; Grisotto *et al.*, 2001; Kroll-Palhares *et al.*, 2008; Medeiros *et al.*, 2009). A infecção pelo *T. cruzi* resulta em aumento da frequência de células T CD8⁺ expressando LFA1⁺ no sangue e na formação de infiltrado celular rico em células CD8⁺LFA1⁺ no tecido cardíaco (Dos Santos *et al.*, 2001). De modo relevante, VCAM-1, ligante de LFA-1, cuja expressão no endotélio dos vasos sanguíneos do tecido cardíaco é aumentada na infecção pelo *T. cruzi* (Dos Santos *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2015), foi mostrado ser relevante para a migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco e para o controle da infecção neste tecido (Michailowsky *et al.*, 2004). A infecção pelo *T. cruzi* resulta em aumento da ativação celular, como aumento da frequência de células ativadas, coexpressando CCR5 e LFA-1 na fase aguda e crônica da infecção e principalmente entre as células T CD8⁺ (Medeiros *et al.*, 2009; Silverio *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2015). Também, utilizando-se um antagonista de

receptores CCR1 e CCR5 de camundongos, Met-RANTES, foi mostrado que o tratamento de animais agudamente infectados pelo *T. cruzi* com este antagonista reduz a migração celular para o tecido cardíaco, com redução do número de células CCR5⁺, e da lesão tecidual, mas sem interferir no controle do parasito (Marino et al., 2004). Já na fase crônica da infecção, ainda que não haja redução significativa da inflamação cardíaca, a administração de Met-RANTES reduziu a lesão de cardiomiócitos (Medeiros et al., 2009).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, há redução da frequência de células T periféricas que apresentavam baixa expressão de L-selectina (CD62L) e CD45RA (Dos Santos et al., 2001; Grisotto et al., 2001; Pereira et al., 2015), moléculas expressas predominantemente por células T não efectoras (Sallusto et al., 1999). Por outro lado, observa-se aumento da frequência de células que apresentam expressão aumentada de CD44, LFA-1 e o antígeno de aparecimento tardio (VLA)-4 (Dos Santos et al., 2001; Pereira et al., 2015), moléculas estas que indicam estado ativado e propiciam a interação e o recrutamento de células para o endotélio lesionado através de sua ligação com componentes da matriz extracelular e moléculas presentes no tecido cardíaco (Dos Santos et al., 2001; Grisotto et al., 2001). Nossos dados recentes indicam que na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* o aumento da proporção de células T CD8⁺ LFA1⁺CCR5⁺ ou CD44⁺CD62L^{-low}, com perfil de ativação celular, assim como da ativação do endotélio cardíaco, com expressão de VCAM-1, estão relacionados à gravidade da CCC experimental (Pereira et al., 2014 b; Pereira et al., 2015). De modo altamente relevante, quando animais cronicamente infectados foram tratados com o imunomodulador pentoxifilina, um inibidor da expressão do receptor 1 de TNF (TNFR1), estes perfis de ativação foram reduzidos, assim como a expressão de VCAM-1 nos vasos sanguíneos do tecido cardíaco, foram parcialmente revertidos, resultando na melhora das alterações elétricas e da função cardíaca (Pereira et al., 2015).

2.2.3. Infiltrado inflamatório no tecido cardíaco: composição e papel funcional

Desde a descoberta da DC, os primeiros achados histopatológicos mostravam o coração como órgão de tropismo para ação do *T. cruzi* (Vianna, 1911). Distúrbios clínicos e achados de necropsia observados por Carlos Chagas e Gaspar Vianna já demonstravam um intenso parasitismo cardíaco, com focos inflamatórios que variavam de focais a difusos (Chagas, 1910; Vianna, 1911), além de anormalidades elétricas e arritmias em cerca de 50% dos

casos agudos (Laranja *et al.*, 1956).

Durante o curso da DC, diversos tipos celulares mononucleares são encontrados nos infiltrados inflamatórios cardíaco. Macrófagos e linfócitos B são encontrados em menor frequência enquanto que neutrófilos são apenas vistos durante a fase crônica (Dos Santos *et al.*, 2001). Por outro lado, a presença de linfócitos T nesses infiltrados é marcante e embora células T CD4⁺ e CD8⁺ estejam presentes, o componente predominantemente nesses focos é composto por células T CD8⁺ (Higuchi Mde *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Dos Santos *et al.*, 2001).

Estudo recente de nosso laboratório demonstrou que durante a infecção pelo *T. cruzi*, populações de células T CD8⁺ encontram-se funcionalmente segregadas em células com perfil citotóxico, que expressam Pfn e perfil inflamatório IFN γ ⁺. Estas células estão compartimentalizadas, encontrando-se principalmente células T específicas para molécula do parasito CD8⁺IFN γ ⁺ em sangue periférico e células T CD8⁺Pfn⁺ em tecido cardíaco. Neste estudo, os animais deficientes nas células CD8⁺, quando reconstituídos com células CD8⁺ de animais deficientes em IFN γ apresentam acúmulo de células Pfn⁺ em tecido cardíaco e aumento nos níveis da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB), um importante indicador de lesão cardíaca. Por outro lado, a reconstituição com células CD8⁺ de animais deficientes em Pfn revelou acúmulo de células produtoras de IFN γ e redução da lesão cardíaca. Esses dados levaram a propor que as populações segregadas têm papéis antagonicos, tendo células T CD8⁺IFN γ ⁺ um papel protetor e as células T CD8⁺Pfn⁺ papel deletério na injúria cardíaca e nas alterações elétricas (Silverio *et al.*, 2012).

Hoje é consenso que na infecção pelo *T. cruzi*, o parasito mobilize vários mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida. Como consequência, várias células e mediadores inflamatórios da resposta imune são recrutados (Higuchi Mde *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Dos Santos *et al.*, 2001). Essa resposta inflamatória, na maioria dos casos, consegue diminuir a multiplicação parasitária. Contudo, o parasito persiste no hospedeiro, assim como a resposta imune a ele dirigida (Dos Santos *et al.*, 2001; Teixeira, Gazzinelli & Silva, 2002). Essa persistência pode ser resultado da ação de mecanismos evolutivos, como a presença da TS e a modificação de glicanas terminais das células, que permitiram ao parasito subverter o sistema imune e perpetuar a infecção. Dessa forma, conhecer as alterações decorrentes da interação do *T. cruzi* e suas moléculas com células e moléculas do hospedeiro, decorrentes da resposta imune, têm grande relevância para o

entendimento da patologia e representa algo promissor para o desenho de intervenção terapêutica visando melhor prognóstico dos portadores da doença de Chagas.

2.3. GLICOBIOLOGIA

2.3.1. Glicobiologia: histórico e evolução

Estudados desde o século XII, os carboidratos ganharam espaço e importância na biologia, de tal forma que hoje possuem uma parte reservada somente à busca de conhecimento sobre sua química, bioquímica e biologia celular (Varki & Sharon, 2009). Açúcares, como são conhecidos pela maioria, deixaram de ser considerados apenas como fonte de energia na cadeia alimentar e ganharam um papel essencial em praticamente todos os processos celulares: interações celulares, interação célula-parasito, maturação de linfócitos, apoptose e ativação celular. Carboidratos também compõem a matriz estrutural da célula e a matriz extracelular. Devido a sua distribuição e papel em funções biológicas diversas, hoje têm sido propostos como candidatos a biomarcadores para diversas patologias (Varki, 2007; Varki & Lowe, 2009; Varki & Schauer, 2009; Varki & Sharon, 2009).

Carboidratos têm estrutura química mais diversificada e variada que a das proteínas e ácidos nucleicos, apresentam fórmula básica $(CH_2O)_n$, podem ter de três a nove átomos de carbono, sendo as hexoses as mais comuns, que têm a glicose como seu principal representante. A construção de carboidratos em células segue um fluxo, desde o início da sua formação no retículo endoplasmático onde os primeiros monossacarídeos são acrescentados em proteínas, passando pelo complexo de Golgi, havendo um refinamento na construção das glicanas e a partir daí serão finalmente empacotados e distribuídos pela célula ou para o meio exterior. Também, no complexo de Golgi, oligossacarídeos recebem na posição terminal o ácido siálico, açúcar terminal envolvido em diversos processos de interação celular (Figura 2.2).

Apesar de sua grande importância em processos biológicos, pouco se sabia sobre a bioquímica e estrutura de carboidratos devido às dificuldades de sequenciamento, que não podem ser preditas a partir de uma fita de ácido desoxirribonucleico (DNA). Assim, grande parte do estudo de carboidratos foi deixado em segundo plano até que a partir da década de 1970 o surgimento de novas técnicas de análise e detecção de glicanas, como cromatografia, eletroforese e espectrometria, permitiu ampliar o estudo desses compostos (Varki & Sharon, 2009)

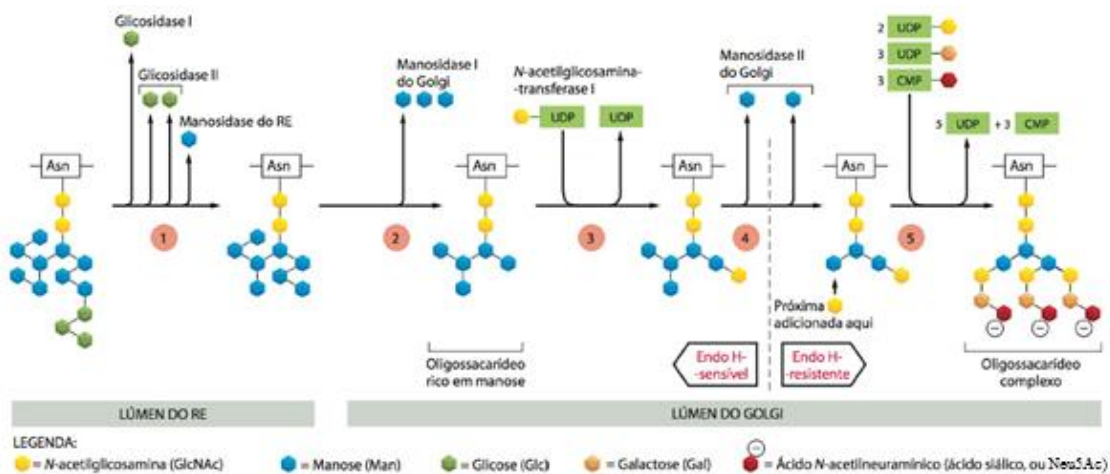


Figura 2.2: Esquema simplificado das etapas de adição e subtração de monossacarídeos desde o lúmen do retículo endoplasmático até o complexo de Golgi. Retirado *Biologia Molecular da Célula, The Cell*, Bruce Alberts, 5ª Edição.

2.3.2. Glicobiologia: da fisiologia a alterações patológicas

As células dos organismos vivos estão cobertas por uma densa camada de moléculas. Esta é formada por proteínas e lipídeos que atravessam a membrana plasmática permitindo a comunicação entre meio exterior e interior. Os lipídeos e proteínas podem ou não carrear estruturas glicanas (glicoproteínas e glicolipídeos) que podem interagir com moléculas existentes no meio ou em outras células e enviar informações para serem processadas no núcleo da célula.

A grande variedade e distribuição dos carboidratos dão a estes um amplo espectro de funções que vai desde a organização estrutural e atividade moduladora da célula até o reconhecimento específico destas glicanas por outras moléculas, seja do próprio organismo ou de agentes estranhos. Moléculas que se ligam especificamente a terminais glicídicos são chamadas de proteínas que se ligam a glicanas (GBPs) (Varki & Lowe, 2009). As GBPs são divididas em dois grupos: as que reconhecem e se ligam a moléculas do próprio organismo e as que reconhecem e se ligam a moléculas de organismos estranhos, como patógenos, ou mesmo participam de interações simbióticas (Varki & Lowe, 2009). O perfeito funcionamento destas interações específicas proporciona aos organismos o estado de homeostasia que mantém todos os sistemas funcionando.

Por outro lado, hoje já se sabe que pequenas modificações na estrutura das glicanas

podem indicar sérias anomalias como cânceres (Crocì *et al.*, 2014) ou mesmo impedir uma efetiva resposta do sistema imune contra agentes externos, seja ela celular, diminuindo a citotoxicidade de células T CD8⁺ (Freire-De-Lima *et al.*, 2010), ou humoral, influenciando o reconhecimento e especificidade de imunoglobulinas (Fokkink *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015).

Modificações no padrão de glicosilação das células têm sido extensivamente estudados em modelo de cânceres. Terapias como bloqueadores do fator de crescimento endotelial vascular acabam não tendo eficácia, pois logo após o término da terapia os tumores voltam a se desenvolver (Ebos, Lee & Kerbel, 2009). Estudos revelaram que o padrão de glicosilação diferenciado em alguns indivíduos pode determinar uma maior resistência a terapias convencionais bem como uma maior propensão ao surgimento de metástases (Crocì *et al.*, 2014). Com isso, o uso de ferramentas que reconheçam especificamente terminais glicosídicos, como as lectinas, podem ser fortes candidatos a marcadores biológicos.

2.3.3. Lectinas como marcadores biológicos em diversas patologias

Lectinas são proteínas que se ligam especificamente em terminal sacarídico, estejam eles ligados em lipídeos ou proteínas. Foram descobertas, em 1888, por Hermann Stillmark (Moreira *et al.*, 1991), ao perceber que um extrato de semente de mamona (*Ricinus communis*) continha proteínas capazes de aglutinar células vermelhas do sangue (Bies, Lehr & Woodley, 2004; Varki *et al.*, 2009). Porém, apenas a partir da década de 1950 que o estudo sobre as lectinas avançou mais rapidamente, com uso de ferramentas utilizadas para diferenciação dos grupos sanguíneos (Boyd & Shapleigh, 1954; Bies, Lehr & Woodley, 2004).

Mais tarde com estudos envolvendo a diferença de ligação de lectinas entre células normais e tumorais e a descoberta da interação de patógenos e células hospedeiras utilizando-se terminais glicídicos, tornou estas proteínas uma promissora ferramenta para o estudo diagnóstico e molecular de interação célula-célula e célula-patógeno (Boyd & Shapleigh, 1954; Aub, Sanford & Cote, 1965). O influenza vírus, foi o primeiro patógeno a ser descoberto por utilizar GBPs como mecanismo de interação com o hospedeiro utilizando sialidase numa relação dependente de Neu5Ac (Schauer, 2000; Nicholls *et al.*, 2008). A partir deste achado, não demorou muito para que lectinas fossem utilizadas como

ferramentas de diagnóstico em histopatologia e como marcadores de malignidade tumoral (Inbar, Ben-Bassat & Sachs, 1972; Sharon & Lis, 1972). De fato, lectinas exógenas podem ser usadas para a detecção de modificações qualitativas e/ou quantitativas de glicanas presentes em fluídos ou na superfície de células, podendo servir como ferramentas para diagnóstico e prognóstico em diferentes patologias.

As GBPs estão presentes não apenas em plantas, mas também em animais e podem servir como fator de prognóstico para algumas enfermidades como cânceres. Até o momento, sabe-se que galectinas, as GBPs encontradas em animais, participam de processos de seleção positiva e negativa de células T no timo e apoptose celular (Wu *et al.*, 1996; Amado *et al.*, 2004). Nas últimas décadas, as GBPs também têm sido utilizadas como marcadores de malignidade em tumores (Inbar, Ben-Bassat & Sachs, 1972; Sharon & Lis, 1972; Bies, Lehr & Woodley, 2004; Toscano *et al.*, 2007; Bi *et al.*, 2008; Earl, Bi & Baum, 2010). Apesar de fazerem parte da fisiologia normal dos organismos, participando de processos regulatórios, a presença aumentada de galectinas no sangue normalmente está associada a algum tipo de patologia. Em pacientes diagnosticados com câncer, por exemplo, a presença de elevados níveis de galectina-1, que se liga especificamente em terminais Gal β 1-4GlcNAc (lactosamina), pode indicar uma maior predisposição à angiogênese e formação de metástases, além de apresentarem resistência a tratamentos comumente utilizados (Crocì *et al.*, 2014). Galectina-1 e -9 também agem em processos de morte celular, porém reconhecendo diferentes terminais e agindo por diferentes vias (Bi *et al.*, 2008).

Galectinas também têm sido estudadas como fator essencial em processos inflamatórios em tecido cardíaco (Seropian *et al.*, 2013). Na infecção chagásica, galectina-3, que se liga em terminais do tipo β -galactose, está envolvida na adesão do *T. cruzi* ao componente da matriz extracelular laminina e a células musculares da vasculatura cardíaca (Moody, Ochieng & Villalta, 2000; Kleshchenko *et al.*, 2004), sugerindo que esta galectina tenha papel não benéfico, favorecendo à infecção. Aumento nas concentrações de galectina-3 também está associada à formação de tecido fibrótico, agravamento da miocardite e remodelamento da matriz extracelular, com aumento na deposição de colágeno tipo 1 (Ferrer *et al.*, 2014). Dados mais recentes são ainda mais interessantes pois revelam que camundongos deficientes em galectina-3 apresentam reduzido número de células inflamatórias em tecido cardíaco, como macrófagos e linfócitos T CD4 e CD8, menor

intensidade de fibrose e de produção de mediadores inflamatórios, como TNF e IL-1 (Pineda *et al.*, 2015). Recentemente foi mostrado que concentrações de galectina-1 no soro estão mais elevadas em portadores da DC comparados à indivíduos não infectados. Também, galectina-1 reduz a infecção de células musculares *in vitro* e camundongos deficientes em galectina-1 são mais suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*, apresentando maior parasitemia e aumento do número de células inflamatórias no tecido cardíaco (Benatar *et al.*, 2015). Estes dados sugerem que galectina-1 tem papel protetor e galectina-3 um papel deletério na injúria cardíaca causada pela infecção do *T. cruzi*.

2.3.4. Ácido siálico, *Trypanosoma cruzi* e trans-sialidase

A molécula de ácido siálico (Neu5Ac) foi descrita pela primeira vez em 1936 (Blix, 1936), foi extraída de moléculas do tipo mucinas da saliva (do grego *sialos* = saliva) de onde recebeu este nome: componente ácido derivado da saliva ou ácido siálico (Du *et al.*, 2009). Neu5Ac é um açúcar de nove carbonos e está presente em uma ampla variedade de organismos vivos (Varki & Gagneux, 2012). Neu5Ac, é usualmente um açúcar de posição terminal possuindo duas formas isoméricas, quando a hidroxila presente no carbono 2 (C-2) está orientada axialmente (para cima), por convenção se refere a forma α , enquanto que o contrário se refere a forma β . A forma C-2 α -hidroxila está frequentemente ligada ao C-3 ou C-6 de uma galactose ou N-acetilgalactosamina pré-terminal, formando ligações do tipo α -2,3-x e α -2,6-x respectivamente (Varki & Schauer, 2009). Outra forma, menos comum, de ligação encontrada está associada ao carbono 8 (C-8), esta ocorre em cadeias formadas por moléculas de Neu5Ac gerando ligações do tipo α -2,8-x (Varki & Schauer, 2009; Pshezhetsky & Hinek, 2011; Freire-De-Lima *et al.*, 2012).

Células eucariotas e algumas bactérias são capazes de sintetizar Neu5Ac, enquanto que *T. cruzi* é incapaz de produzir tal açúcar (Frasch, 2000; Freire-De-Lima *et al.*, 2015). Desde a descoberta de moléculas de Neu5Ac na superfície da forma epimastigota do *T. cruzi* (Pereira *et al.*, 1980) criou-se a hipótese da existência de uma molécula com ação enzimática capaz de transferir Neu5Ac do organismo hospedeiro para moléculas do tipo mucinas presentes na superfície do parasito.

A transferência de moléculas de Neu5Ac ocorre através da ação de enzimas denominadas neuraminidases ou sialidases. Este tipo de enzima já foi descrito em diversos

organismos como vírus, bactérias, fungos, protozoários, aves e mamíferos (Pshezhetsky & Hinek, 2011).

Em meados da década de 80 Previato e colaboradores demonstraram que a presença de Neu5Ac em glicoconjugados na superfície de epimastigotas do *T. cruzi*, era decorrente de moléculas sialiladas encontradas no meio e que a transferência das moléculas de Neu5Ac era catalisada por componente presente no parasito (Previato *et al.*, 1985) e que mais tarde foi denominada de *trans*-sialidase (TS) (Schenkman *et al.*, 1991). Esta é uma *exo*-sialidase (Achyuthan & Achyuthan, 2001) membro da família glicosídeo hidrolase (GH)-33 (<http://www.cazy.org/GH33.html>) e sua estrutura possui três porções: uma porção N-terminal com função enzimática que catalisa preferencialmente a transferência de Neu5Ac a partir de moléculas doadoras contendo Neu5Ac α -2,3Galp β 1-x para unidades terminais de Galp- β -ligadas, formando exclusivamente ligações α -2,3-x (Frasch, 2000; Dc-Rubin & Schenkman, 2012; Freire-De-Lima *et al.*, 2012). A segunda porção, C-globular com organização estrutural tipo lectina, e a terceira porção C-terminal, formada por uma sequência de repetição de 12 aminoácidos denominada antígeno liberado em fase aguda (SAPA, *shed acute phase antigen*). Esta última porção não está presente em TS encontrada na superfície de epimastigotas, forma presente no inseto vetor (Frasch, 2000; Dc-Rubin & Schenkman, 2012). A presença da porção SAPA em TS aumenta sua meia vida e induz a produção de anticorpos que agem sobre a porção enzimática da proteína (Buscaglia *et al.*, 1998; Frasc, 2000; Dc-Rubin & Schenkman, 2012; Freire-De-Lima *et al.*, 2015). Por último, moléculas de TS estão fixadas na superfície do parasito através de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que ao serem hidrolisadas, liberam a TS para o meio (Frasch, 2000; Dc-Rubin & Schenkman, 2012).

A atividade da TS é independente de citidina monofosfato ácido N-acetil neuramínico (CMP-Neu5Ac), ou seja, ela é capaz de utilizar moléculas de Neu5Ac livres do meio, podendo sialilar glicoproteínas O-glicosiladas (sialoglicoproteínas ou moléculas tipo mucinas) presentes na superfície do parasito (Previato *et al.*, 1985; Mendonca-Previato *et al.*, 2013) ou, de forma semelhante, sialilar glicoproteínas presentes na superfície de células do hospedeiro mamífero (Freire-De-Lima *et al.*, 2010). Essas modificações no perfil de sialilação de glicoproteínas do hospedeiro, ocasionados para a ação da TS, podem modular a invasão de parasitos na célula hospedeira e/ou a resposta das células do sistema imune e servir como biomarcador de infecção na patologia de Chagas.

2.3.5. Alterações glicosídicas na doença de Chagas

Com a utilização de metodologias mais sensíveis, espectrometria de massas, cromatografia líquida e gasosa e uso de lectinas foi possível identificar mudanças nos padrões fisiológicos e patológicos para a detecção do perfil glicosídico presente no *T. cruzi* e nas células do organismo hospedeiro (Pereira *et al.*, 1980; Freire-De-Lima *et al.*, 2010; Mendonca-Previato *et al.*, 2013). O *T. cruzi* tem a capacidade de infectar qualquer tipo celular (Freire-De-Lima *et al.*, 2015). Para que isto ocorra se faz necessário uma interação entre moléculas presentes na superfície do parasito e da célula hospedeira (Oliveira *et al.*, 2014; Freire-De-Lima *et al.*, 2015). Durante a fase aguda da DC, que ocorre entre duas a três semanas após a exposição ao parasito, há intensa parasitemia e parasitismo e maior liberação de TS no soro do organismo hospedeiro. A interação parasito/hospedeiro é possível devido a ação da TS. A presença da TS na superfície do *T. cruzi* é uma das características evolutivas que permitiu não apenas a infecção, mas também a perpetuação deste parasito por longos períodos no interior das células do organismo hospedeiro (Freire-De-Lima *et al.*, 2012; Shenkman *et al.*, 1991).

Em condições fisiológicas, células T CD8⁺ maduras selecionadas positivamente no timo, são liberadas na corrente sanguínea com um perfil PNA^{low}. A lectina *Peanut agglutinin, Arachis hypogaea* (PNA) se liga especificamente ao terminal pré-siálico Galβ1-3GalNAcα1-Ser/Thr, o mesmo terminal de ação para TS. Quando as células T CD8⁺ são apresentadas a antígenos, passam a expressar o perfil PNA^{high}, mostrando que um perfil ativado indica perda do ácido siálico dessas células (Amado *et al.*, 2004). Estudo utilizando anticorpo S7 mAb, que reconhece epítomos contendo Neu5Ac em CD43, demonstrou que esta molécula é um importante aceptor de Neu5Ac em células T (Jones *et al.*, 1994). O uso deste mesmo anticorpo em camundongos deficientes em ST3Gal-I sialiltransferase, mostrou que a molécula de CD43 pode ser um provável sítio de ação da TS (Freire-De-Lima *et al.*, 2010). Células T CD8⁺ oriundas das infecção pelo *Plasmodium berghei*, protozoário que não expressa TS, apresentam fenótipo PNA^{high}. Por outro lado, o cultivo de células T CD8⁺ de camundongos infectados com a celda Y do *T. cruzi* ou infectados e tratados com a forma ativa recombinante de TS (aTS) induziu fenótipos PNA^{interm} (intermediário) e PNA^{low}, respectivamente, sugerindo que a Tsa é capaz de sialilar a superfície das células T CD8⁺

(Freire-De-Lima *et al.*, 2010). De modo interessante, células T CD8⁺ que perdem a expressão para ligantes de PNA, após re-sialilação pela TS, demonstraram redução da ação citotóxica em ensaios *in vitro* e da atividade de reconhecimento antigênico e citotoxicidade *in vivo*, esta pode ser uma estratégia para subverter a resposta imune do hospedeiro (Freire-De-Lima *et al.*, 2010).

Como dito anteriormente, modificações no glicofenótipo de células do sistema imune são essenciais para a efetivação de ativação destas células, em especial as células T CD8⁺ (Amado *et al.*, 2004), ao longo dos anos estudos têm demonstrado que durante a infecção pelo *T. cruzi*, a presença da TS é essencial para a patogênese e perpetuação do parasito no organismo hospedeiro (Dias *et al.*, 2008; Freire-De-Lima *et al.*, 2010; Dc-Rubin & Schenkman, 2012). O uso de um inibidor NeuNAcFNP (*2-difluoromethyl-4-nitrophenyl-3,5-dideoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosid acid*) da porção enzimática da TS, através da ligação covalente deste entre Arg245 e Asp247, causa diminuição da infecção de células de mamíferos (Carvalho *et al.*, 2010). Assim, a infecção com um microrganismo que possui mecanismo molecular que resulta na modificação do perfil glicosídico da superfície de células pode favorecer uma estratégia que permita identificar ferramentas para uso como diagnóstico de fases aguda e crônica, assim como presença de alterações glicosídicas associadas a alterações funcionais em células na DC.

3. Hipótese

O cenário de dados apresentados nos levou a propor que durante a infecção pelo *T. cruzi* há alterações de glicofenótipos em proteínas séricas e em subpopulações de linfócitos T CD8⁺ funcionalmente segregadas.

4. OBJETIVO GERAL

Identificar glicofenótipo de N-glicanas de proteínas séricas e em células T de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, procurando identificar biomarcadores de fases aguda e crônica da DC experimental.

4.1. Objetivos Específicos

- (1) Realizar análise molecular de N-glicanas de proteínas do soro de camundongos infectados experimentalmente pelo *T. cruzi*, através de espectrometria de massas;
- (2) Analisar as N-glicanas de proteínas do tecido cardíaco no curso da infecção experimental, através de ensaios histoquímicos usando lectinas;
- (3) Buscar associação de glicofenótipo de células T CD8⁺ com o perfil de funcionalidade inflamatória (IFN γ ⁺) e citotóxica (Pfn⁺).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Com o objetivo de mimetizar aspectos clínicos da DC, utilizamos o modelo experimental com fêmeas de camundongos com 4-8 semanas de idade, da linhagem C57BL/6 (H-2^b). Cerca de 40 animais foram usados em cada experimento de fase aguda e crônica. Esses animais são reproduzidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), chegam ao Biotério do Pavilhão Cardoso Fontes/IOC e são mantidos em adaptação por 10-14 dias em condições livres de patógenos específicos (SPF). Os animais são acondicionados em gaiolas de polipropileno dentro de estantes ventiladas ou microisoladores e recebem ração e água *ad libitum* durante todo curso do ensaio. Os procedimentos experimentais foram realizados e aprovados segundo as normas da Comissão de Ética de Uso de Animais da Fiocruz - CEUA/Fiocruz (LW 10/14). Os experimentos que compõem esta dissertação estão registrados e os dados descritos nos Livros de Experimentação do LBI/IOC #53 e #57.

5.2. Infecção experimental pela cepa Colombiana do *T. cruzi*

Para o presente trabalho, camundongos da linhagem C57BL/6, foram infectados pela via intraperitoneal com um inóculo de 100 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana do *T. cruzi*, suspensos em 0,2 mL de tampão salina estéril. As formas tripomastigotas utilizadas foram isoladas de um portador da DC crônica (Federici, Abelman & Neva, 1964; Andrade, 1974), atualmente classificada como *T. cruzi* I (Zingales *et al.*, 2009) e mantida por passagens seriadas em camundongos isogênicos a cada 35-45 dias, no Laboratório de Biologia das Interações (LBI/IOC), a fim de avaliar a suscetibilidade desses animais à infecção. Animais controles, não infectados (NI) de mesma idade e sexo, receberam salina e foram mantidos sob as mesmas condições no Biotério de Experimentação Animal do Pavilhão Cardoso Fontes/IOC.

5.3. Curvas de parasitemia, mortalidade e acompanhamento clínico

Para determinar o curso da infecção, com identificação das fases aguda e crônica, a parasitemia foi determinada semanalmente através do método de Brener (1962). Este consiste em colocar 5µL de sangue obtido da cauda do animal, entre lâmina microscópica e lamínula (22x22 mm). Foram observados 100 campos microscópicos utilizando a objetiva de 40x, sendo determinado o número de parasitos/mL de sangue (ver fórmula abaixo para cálculo da parasitemia). A parasitemia foi utilizada como parâmetro para definição dos vários estágios da infecção experimental pelo *T. cruzi*. De acordo com as observações realizadas previamente em nosso laboratório (Talvani *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2001), os animais infectados apresentam um primeiro estágio caracterizado pelo raro encontro ou mesmo ausência do parasito na corrente sanguínea e um segundo pelo crescimento exponencial deste, que culmina entre os 42°-49° dia pós-infecção (dpi). Finalmente, um terceiro estágio, no qual o número de parasitos decresce na corrente sanguínea até a negatificação da parasitemia ou encontro de raros parasitos no sangue circulante. Portanto, consideramos que a partir do 30° dia após a negatificação ou diminuição marcante da parasitemia os animais encontram-se em fase crônica, considerada a partir do 90° dpi (Camandaroba *et al.*, 2006). O estado clínico dos animais foi analisado semanalmente, assim como registros de morte.

$$\text{Cálculo da parasitemia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de parasitos em 100 campos} \times 3111^*}{10^4}$$

*Número de campos em uma lamínula de 22x22 mm

Para acompanhamento clínico, além da observação das condições físicas externas, os animais foram pesados usando balança própria para pesagem de roedores (balança Sartorius, ED623S-OCE; EUA) e a temperatura retal foi aferida usando termômetro retal (DT-610B *Thermocouple Thermometer*) semanalmente. Além disso, os animais foram analisados quanto às alterações elétricas. Para isto, em 14, 42 e 120 dias pós-infecção os animais foram tranquilizados com diazepam (10mg/kg) e os transdutores foram colocados subcutaneamente na derivação DII. Os traçados foram registrados por 2 minutos usando o sistema digital Power Lab 2/20 conectado a um bio-amplificador a 2 mV por 1 segundo (PanLab Instruments, Espanha). Os filtros foram padronizados entre 0,1 e 100 Hz e os traçados analisados usando o *software* Scope software for Windows V3.6.10 (PanLab Instruments, Espanha). Os parâmetros do eletrocardiograma (ECG) analisados foram:

frequência cardíaca, duração de onda P, intervalos, PR, QRS e QT corrigido (QTc), como anteriormente descrito (Silverio *et al.*, 2010). Também, mostramos a frequência de animais com arritmias, com bloqueio átrio-ventricular de segundo grau (BAV2) e de animais que apresentam qualquer alteração elétrica.

5.4. Obtenção de soros e preparos de amostras para análise de perfil de N-glicanas em proteínas séricas

Para avaliar o perfil de N-glicanas contido em proteínas séricas, sangue total foi obtido através de punção pelo seio retro-orbital, após anestesia local dos animais (cloridrato de proximetacaína 0,5%), com o auxílio de pipeta Pasteur sem anticoagulante, seguido de morte dos animais por deslocamento cervical e posterior retirada do coração e baço, segundo delineamento experimental. O sangue foi acondicionado em tubos de 1,5 mL, tipo Eppendorf, e deixados para coagular por um período não superior a duas horas a uma temperatura de 4°C (quatro graus célsius). Após este período o sangue foi centrifugado em microcentrífuga (Thermo Electron Corporation – IEC – Micromax RF – Refrigerated Microcentrifuge, EUA) por 10 minutos a uma velocidade de 1000 g e uma temperatura de 4 °C. O soro foi separado, com o auxílio de pipetas, para tubos limpos de 0,5 mL, tipo Eppendorf, e congelados à temperatura de -80 °C até o momento do preparo das amostras.

5.5. Espectrometria de massas por MALDI-TOF

5.5.1. Extração de N-glicanas

Para o preparo das amostras de soro e posterior leitura em espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF (Voyager DE.str; PerSeptive Biosystems Inc, EUA) e avaliação do perfil de N-glicanas em proteínas presentes no soro, este foi descongelado à temperatura ambiente e 50 µL de cada amostra foi transferida para tubos de vidro de 2 mL, imediatamente congeladas à -80 °C e postas para liofilizar em liofilizador (VirTis, BenckTop K, EUA) por um período mínimo de 12 horas. Após este período as amostras foram ressuspensas em 500 µL de NH₄HCO₃-50mM e desnaturadas em 12,5 µL de tampão de desnaturação SDS (*sodium dodecil sulfate*) + β-mercapto etanol e fervidas a 100 °C por 20 minutos em banho-maria. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e adicionadas de 500 µL de

NH_4HCO_3 -50 mM mais 50 μL de um agente detergente NonidetTM-P40 (Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados, em cada amostra, 5 μL de enzima PNGase F solution (RocheTM, EUA), que cliva especificamente glicanas N-ligadas e postas para incubar em agitador por período mínimo de 12 horas. As proteínas presentes nas amostras foram então precipitadas com etanol gelado, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos e $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos, após este período as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram concentrados em evaporador até um volume final de aproximadamente 500-1000 μL , água ultrapura foi adicionada para que as amostras fossem congeladas e liofilizadas por período mínimo de 12 horas. Colunas de C18 foram lavadas com 10 mL de metanol (#322415 Sigma-Aldrich, EUA) e primadas com quatro a seis volumes da coluna com uma solução de acetonitrila (ACN) 5 % e ácido trifluoracético (TFA) 0,1 %. As amostras reconstituídas com 500 μL de uma solução de TFA 0,1 % foram adicionadas às colunas sem exercer pressão e eluídas com 6 mL da solução 5 % ACN / H_2O / 0,1 % TFA, todas as amostras foram congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ e postas para liofilizar por período mínimo de 12 horas. Colunas de grafite foram lavadas seis vezes com cada uma das soluções: ACN 75 % / ACN 50 % / ACN 25 %, quando então foram aplicadas as amostras reconstituídas com solução de TFA 0,1 % sem exercer pressão. As colunas foram lavadas com solução de TFA 0,1 % e as amostras eluídas a seguir com 3 mL de ACN 50 % e 3 mL de ACN 25 %, todas foram congeladas e liofilizadas com período de 12 horas.

5.5.2. Permetilação

As amostras liofilizadas do processo de extração de glicanas foram ressuspensas em 400 μL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) e 200 μL de iodeto de metila (CH_3I) acrescido de uma pequena quantidade de hidróxido de sódio (NaOH) e postas em sonicador (20.000 Hz) por 2 horas. Após esse período foi acrescentado a cada amostra um volume de 2 mL de clorofórmio e 1 mL de solução saturada de Tiosulfato de sódio (ponto de saturação: 701 g/L). A seguir, foram feitas dez lavagens por centrifugação 800 g por 2 minutos das amostras, acrescentando e descartando 6 mL de água ultrapura em cada lavagem. O produto final foi seco em tubos de vidro em nitrogênio gasoso, ressuspense em 500 μL de água ultrapura que foi congelada a menos $80\text{ }^\circ\text{C}$ e liofilizados por período de 12 horas.

5.6. Imunoistoquímica (IHS)

Visando diferenciar cortes de tecidos seriados entre animais não infectados e infectados, para observação de infiltrados inflamatórios e alterações glicosídicas nos cortes a análise imunoistoquímica foi feita através do método de imuno-peroxidase, modificado por Lannes-Vieira e colaboradores (Lannes-Vieira, Dardenne & Savino, 1991). Para a realização desta metodologia, o tecido cardíaco e parte do baço foram retirados, incluídos em carboximetilcelulose (Tissue Tek OCT Compound, Miles Inc., EUA) e armazenados em nitrogênio líquido até sua utilização. Cortes seriados de 5µm foram feitos em criostato (Reichert-Jung Cryocut 1800, Alemanha) a -25 °C e aderidos a lâminas lisas de vidro (previamente lavadas, desengorduradas com solução álcool etílico-éter etílico 1:1 e revestidas com solução aquosa de Poli-L-lisina a 0,005 % p/v (P-1524 Sigma, EUA). Após secagem por 1h à temperatura ambiente, os cortes foram fixados com acetona gelada (mantida a -20 °C) durante 10 minutos, lavados 2 vezes durante 5 minutos com PBS (pH 7,2-7,4) e os receptores Fc foram bloqueados com soro normal de cabra 1/50 diluído em PBS-BSA 1%, azida sódica 0,1%, durante 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, foram adicionados os anticorpos primários purificados (Tabela 5.1) durante um período de 12 horas em câmara úmida a temperatura de 4°C. Seguindo incubação, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS durante 5 minutos cada e foram adicionados os anticorpos secundários ligados à biotina (Tabela 5.1) durante 40 minutos em câmara úmida. Seguiram-se 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS e então os cortes foram incubados com o revelador estreptoavidina-peroxidase (Amershan) durante 40 minutos em câmara úmida. Após 3 lavagens com PBS durante 5 minutos, os cortes foram revelados em solução de revelação: 50 µL 9-amino 3-etil carbazol 0,8 % (Sigma, EUA), 5 µL peróxido de hidrogênio 3 % em 950 µL de tampão acetato de sódio (Sigma, EUA) 0,1 M pH 5,2. Esta solução foi colocada sobre os cortes previamente banhados com tampão acetato de sódio e as lâminas foram colocadas em câmara escura para revelação acompanhada periodicamente ao microscópio óptico. A fim de parar a revelação, as lâminas foram imersas em água, em seguida os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer (DAKO, EUA) durante 5 minutos e depois contrastados em água durante alguns minutos também com observação ao microscópio óptico. As lâminas foram secas e cobertas com meio de montagem aquosa Faramount (DAKO, EUA) e sobrepostas por lamínula. Os cortes foram analisados ao

microscópio óptico (Nikon, Japão), fotografados e analisados utilizando o programa NIS-Elements (Nikon, Japão).

Tabela 5.1: Anticorpos utilizados na técnica de imunistoquímica

Anticorpos	Clone/Origem/Fornecedor	Diluição
anti-FN (purificado)	Policlonal, coelho, Gibco-BRL	1/800
Anti-Ig de coelho-biotina	Amersham	1/500
estrepto-avidina-peroxidase	Amersham	1/100
Lectina PNA conjugada à biotina	L-6135, Sigma-Aldrich	1/200
Lectina SNA conjugada à biotina	FL-1301 Vector Laboratórios	1/200
Lectina MAL conjugada à biotina	B-1265 - Vector Laboratórios	1/100

5.7. Obtenção de células mononucleares isoladas do baço

O baço foi retirado e macerado em meio Hanks (*Hank's Balanced Solution* #BR30015-05, Sigma, EUA) em homogeneizador de tecido do tipo Potter. A suspensão celular obtida foi lavada em 5mL de Hanks e centrifugada a 800 g durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspense em tampão para lise de hemácias (*Red Blood Cell Lysing Buffer*, R7757, Sigma, EUA), durante 5 minutos à temperatura ambiente e com agitação ocasional. Seguindo esta incubação, foram adicionados 10 mL de solução de Hanks gelado e as suspensões celulares centrifugadas a 800 g durante 5 minutos a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, outra lavagem com solução de Hanks foi realizada a 4 °C. O precipitado celular foi ressuspense em 1 mL de solução PBS contendo 2 % de soro bovino fetal (SBF) e 0,1 % NaN₃ para ensaios de citometria de fluxo ou em meio RPMI suplementado (2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 10 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 5x10⁻⁵ M de β-mercaptoetanol, 10 mM de HEPES e 1% de soro normal de camundongo) para ensaios de estimulação celular. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan 0,04 % e as suspensões celulares com viabilidade >95 % foram utilizadas.

5.8. Marcação extra e intracelular de esplenócitos por citometria de fluxo (FACS)

Inicialmente, as suspensões celulares foram bloqueadas em solução de soro normal de camundongo a 2 % em solução de PBS-SBF 2 % e NaN₃ 0,1 % durante 30 minutos a 4 °C. A seguir, cerca de 1x10⁶ células/100 µL/poço foram distribuídas em placas de poliestireno de 96 poços (Falcon 3911, EUA). Para realizarmos a marcação de superfície, 20 µL dos anticorpos (Tabela 5.2) diluídos em solução de PBS-SBF 2 % e NaN₃ 0,1 % foram adicionados às células e incubados durante 40 minutos a 4 °C. Seguindo a incubação, foram realizadas lavagens com 150 µL de PBS-SBF 2 % e NaN₃ 0,1 % /poço durante 5 minutos a 600 g a 10 °C e fixação em solução de PBS-formaldeído a 1 %.

Com relação à marcação intracelular, as suspensões celulares foram previamente deixadas em cultura na presença de proteína inibidora de transporte intracelular, Monensina (BD Golgi Stop™ Cat 554724, EUA) na relação de 4 µL de solução estoque para cada 6 mL de meio, durante 4 horas a 37 °C em ambiente contendo 5 % CO₂. Inicialmente foi realizada a marcação extracelular, como descrito anteriormente, e logo após a fixação em paraformaldeído (PFA) a 1 % as células foram lavadas e permeabilizadas em solução de permeabilização (PBS-SBF 2% NaN₃ 0,1 % contendo saponina 0,1 %). Após, 20µl dos anticorpos diluídos em solução de permeabilização foram adicionados às células e incubados durante 40 minutos a 4 °C. Por fim, as células foram fixadas em PBS-formaldeído 1 % e mantidas a 4 °C até a leitura em citômetro de fluxo (Beckman Coulter - CyAn 7 Color flow cytometer, EUA), sendo adquiridos 200.000-300.000 eventos por amostra. Para leitura consideramos os seguintes parâmetros: desvio frontal (FSC) e lateral (SSC) do laser e intensidade de fluorescência e as análises dos dados foram feitas no programa Summit 4.3.

Tabela 5.2: Anticorpos utilizados para citometria de fluxo.

Anticorpos	Clone/Origem/Fornecedor	Diluição
anti-CD4 conjugado à PercP	GK1.5, IgG2a, rato, anti-mouse, BD PharMingen	1/400
anti-CD8 α conjugado à APC	53-6.7, IgG2a, rato, anti-mouse, BD PharMingen	1/15
anti-CD8 α conjugado à PercP	53-6.7, rato, anti-mouse, BD PharMingen	1/100
anti-CD4 conjugado à FITC	Mouse regulatory T cell Staining Kit, eBioscience	1/80
Anti-TCR β conjugado à PE	H57-597, hamster anti-mouse, BD PharMingen	1/200
anti-CD62L conjugado à PE	MEL-14 , IgG2a , rato, Caltag	1/20
anti-CD44 conjugado à PE	IM 7, rato, anti-mouse, BD PharMingen	1/100
anti-CD45RA conjugado à PE	14.8, anti-mouse, BD PharMingen	1/30
anti-CCR7 conjugado à PE-Cy7	4B12, CD197, EBI-1, anti-mouse, eBioscience	1/10
anti-CCR5 conjugado à PE	CD195, rato, anti-mouse, BD PharMingen	1/10
anti-CCR1 conjugado à PerCp	sc-6125, lote # E0809, Santa Cruz Biotechnology	1/10
anti-LFA-1 conjugado à PE-Cy7	2D7, rato, anti-mouse, BD Bioscience	1/10
anti-IFN γ conjugado à PE-Cy7	XMG1.2, rato, anti-mouse, BD PharMingen	1/10
anti-Pfn conjugado à FITC	mAb(CB5.4), mouse, Enzo Life Sciences	1/5
anti-Pfn conjugado à APC	eBioOMAK-D, anti-mouse, eBioscience	1/8
Estrepto-avidina conjugado à APC	eBioscience	1/200
Lectina PNA conjugada à FITC	L-7381, Sigma-Aldrich	1/200
Lectina SNA conjugada à FITC	FL-1301 – Vector Laboratórios	1/200
Lectina MAL conjugada à biotina	B-1265 - Vector Laboratórios	1/100

6. RESULTADOS

6.1. Parasitemia e sobrevivência

Inicialmente, caracterizamos o modelo experimental de infecção a ser usado em nossos estudos. Os animais da linhagem C57BL/6 apresentaram parasitos circulantes a partir de 14 dias pós-infecção (dpi), o pico de parasitemia ocorreu entre 42-45 dpi. Raros parasitos foram encontrados no sangue circulante após 90 dpi, caracterizando a fase crônica da infecção (Figura 6.1A). Cerca de 70% dos camundongos sobreviveram à fase aguda, sem tratamento tripanossomicida, e desenvolveram a fase crônica da infecção (Figura 6.1B).

6.2. Parâmetros clínicos: peso, temperatura e alterações elétricas

Durante toda a cinética da infecção experimental pelo *T. cruzi*, os animais foram acompanhados semanalmente quanto ao seu peso, expresso em gramas (g) e à sua temperatura expressa em graus Célsius (°C). Não detectamos alterações significativas na variação de peso durante o período de experimentação ao se comparar animais não infectados com infectados (Figura 6.2A). Por outro lado, houve variação na temperatura retal entre os experimentos. No experimento mostrado na Figura 6.2B, observamos diminuição na variação da temperatura retal nos dias 21 a 56 e em 120 dpi nos animais infectados quando comparados animais não infectados pareados quanto à idade e sexo (Figura 6.2B). A análise de ECG revelou que, comparados a animais não infectados pareados por idade e sexo, em 14 dpi os animais não apresentam alterações de ECG. Em 42 dpi, os animais apresentam bradicardia, aumento da duração da onda P e dos intervalos PR, e QTc. Na fase crônica (120 dpi), todos os animais apresentam alterações no ECG, com bradicardia, aumento da duração da onda P e dos intervalos PR, e QTc, em comparação com animais não infectados e pareados por idade e sexo. A síntese dos dados revelou que arritmia se estabelece na fase aguda (42 dpi) em todos os animais e persiste na fase crônica (120 dpi). As alterações de BAV2 são observadas em 60% dos animais na fase aguda (42 dpi) e em 100% dos animais na fase crônica (120 dpi). Todos os animais apresentaram alterações elétricas de naturezas variadas (BAV1, BAV2, arritmia) na fase aguda (42 dpi) e crônica (120 dpi), quando comparados a animais não infectados pareados por idade e sexo (Figura 6.3A-H).

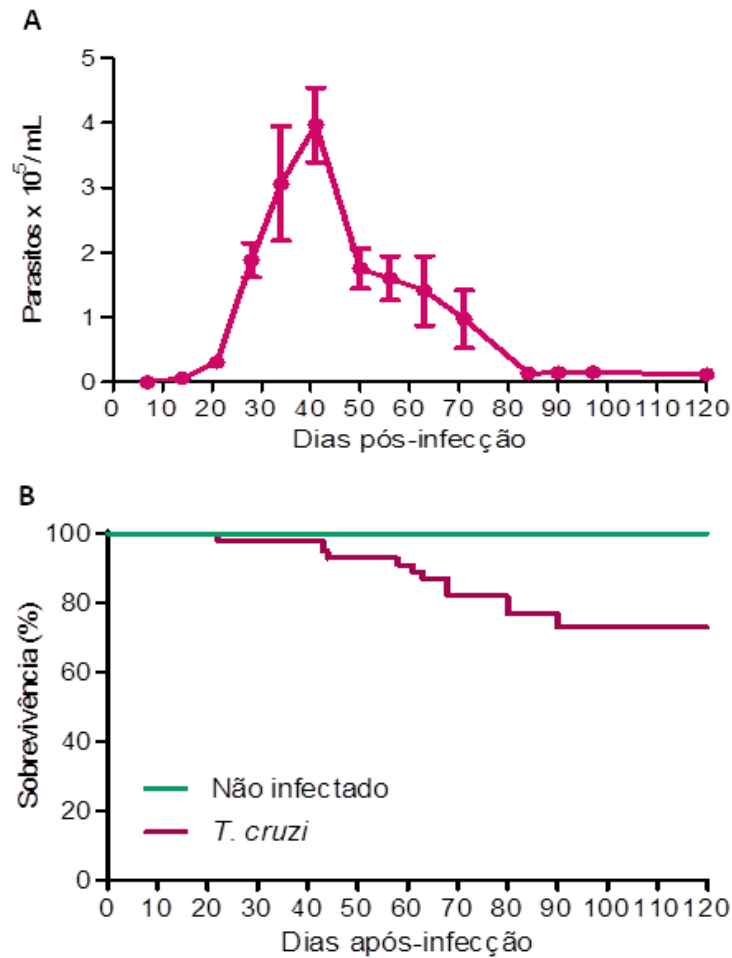


Figura 6.1: Curvas de parasitemia e sobrevivência de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e acompanhados semanalmente para avaliação (A) do nível de parasitemia e (B) taxa de sobrevivência. Dados mostram média \pm desvio padrão. Gráficos representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

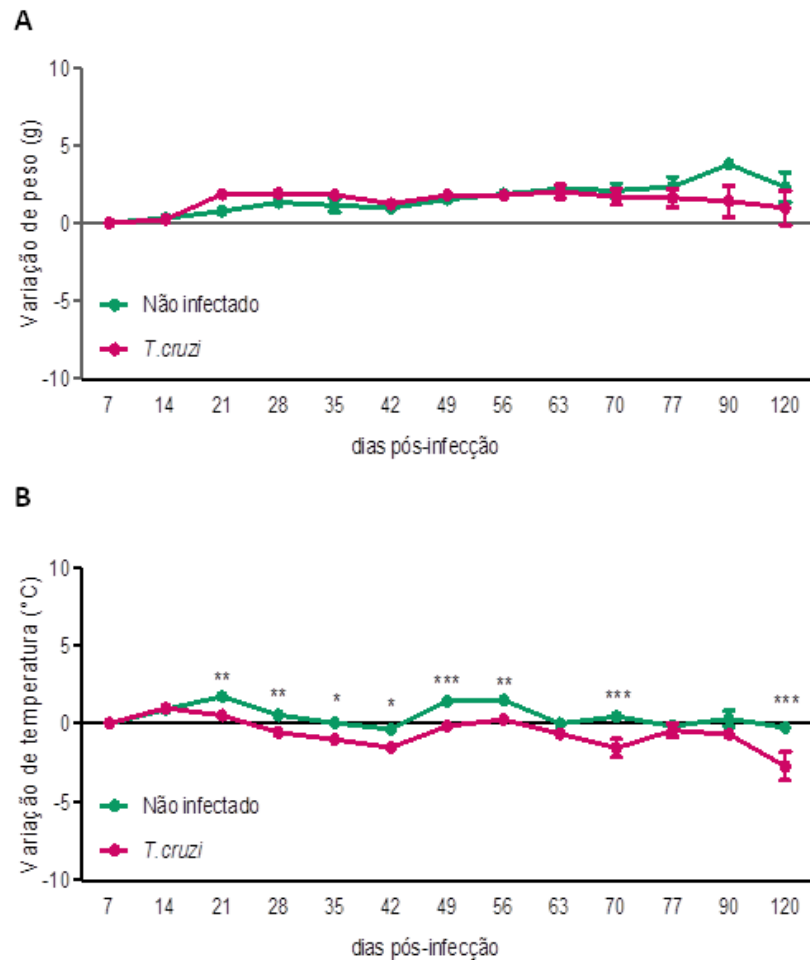


Figura 6.2: Curvas de variação de peso e temperatura de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e acompanhados semanalmente para avaliação (A) do peso dos animais, expresso em gramas (g), e (B) variação de temperatura retal expressa em graus Célsius (°C). Dados mostram média \pm desvio padrão. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Gráficos representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

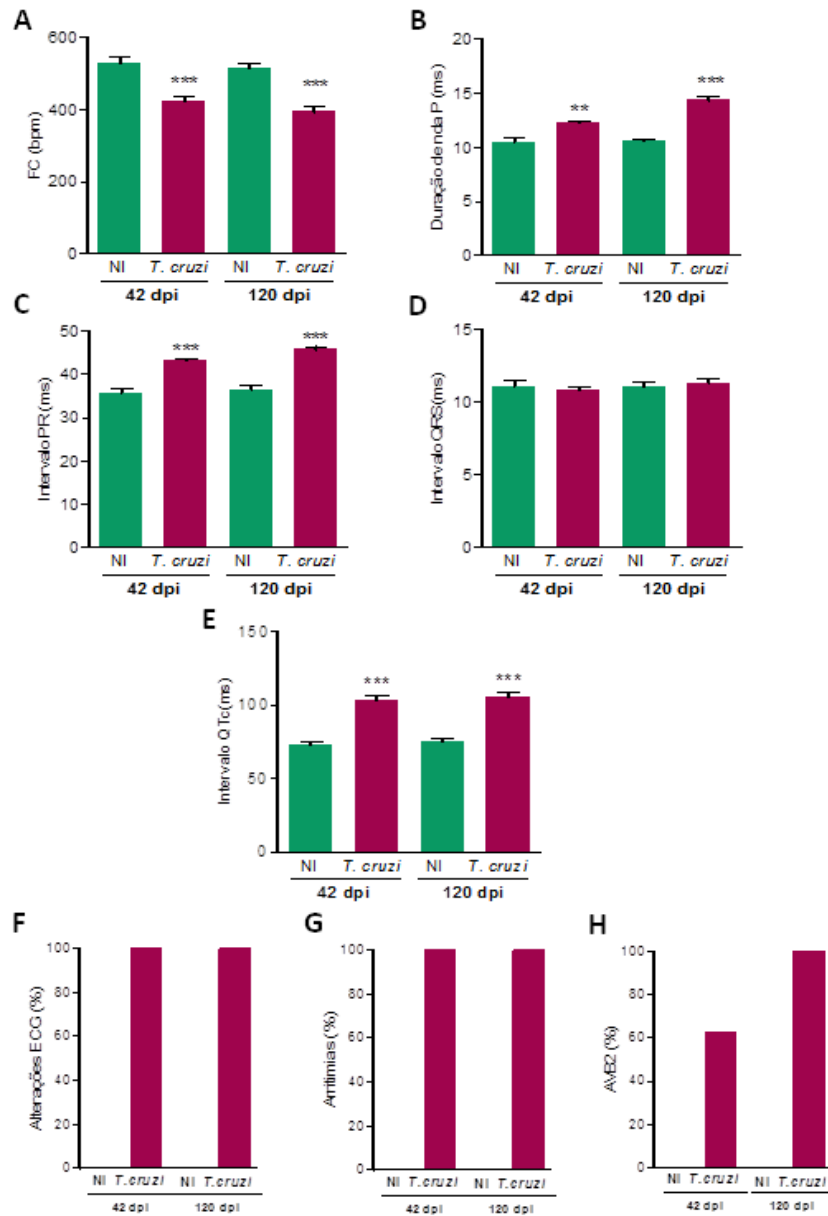


Figura 6.3: Alterações elétricas em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e acompanhados semanalmente para avaliação dos seguintes parâmetros: (A) Frequência cardíaca (FC; bpm, batimentos por minuto), (B) duração de onda P, (C) intervalo PR, (D), intervalo QRS, (E) intervalo QTc. A síntese dos dados mostra a porcentagem de animais que apresentam (F) qualquer alteração de ECG, (G) arritmia e (H) bloqueio átrio-ventricular. Dados mostram média \pm desvio padrão. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Gráficos representativos de 3 experimentos. com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.3. Perfil de N-glicanas em proteínas séricas através do ensaio de espectrometria de massas por MALDI-TOF

Usando o ensaio de espectrometria de massas por MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization*), fizemos a análise de N-glicanas extraídas de proteínas do soro de camundongos não infectados e infectados pelo *T. cruzi*, trabalhando com *pool* de soros e individuais. A comparação dos animais não infectados com idade de 6 a 7 (pareados a 14 dpi), 10 a 11 (pareados a 42 dpi) e 20 a 21 (pareados a 120 dpi) semanas de vida revelou que com o envelhecimento dos animais não há variação dos padrões de glicosilação das proteínas dos soros (Figura 6.4A-C). No espectro completo, que mostra uma relação massa/carga (m/z), observamos a presença de glicanas bi e triantenárias. Para facilitar a interpretação dos dados, dividimos o espectro em três regiões. Na faixa do espectro que varia de 1500 a 2500 m/z , observamos o predomínio de glicanas biantenárias ricas em manose e algumas com terminais pré-siálicos e presença de fucose. Na faixa do espectro que varia de 1500 a 3500 m/z , detectamos uma maior frequência de glicanas triantenárias com presença de terminais siálicos e fucose. Na faixa do espectro que varia de 3500 a 4000 m/z , observamos uma menor frequência de glicanas, sendo as encontradas do tipo triantenária com presença de terminal siálico e fucose (Figura 6.4A-C).

A análise das N-glicanas presentes em soro de camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* não revelou diferenças significativas quando comparados com animais não infectados. Contudo, observamos uma diminuição da frequência de glicanas na faixa do espectro de 1500 a 2500 m/z , sendo estas do tipo biantenária com presença de terminal siálico. Também, detectamos a presença de glicanas enriquecidas em manose encontradas apenas nos animais infectados na fase aguda (14 dpi) e persistindo na fase crônica da infecção (120 dpi). Nas faixas 1500 a 3500 e 3500 a 4000 m/z não observamos diferenças quanto à frequência e aos tipos de glicanas encontradas (Figura 6.4A-C).

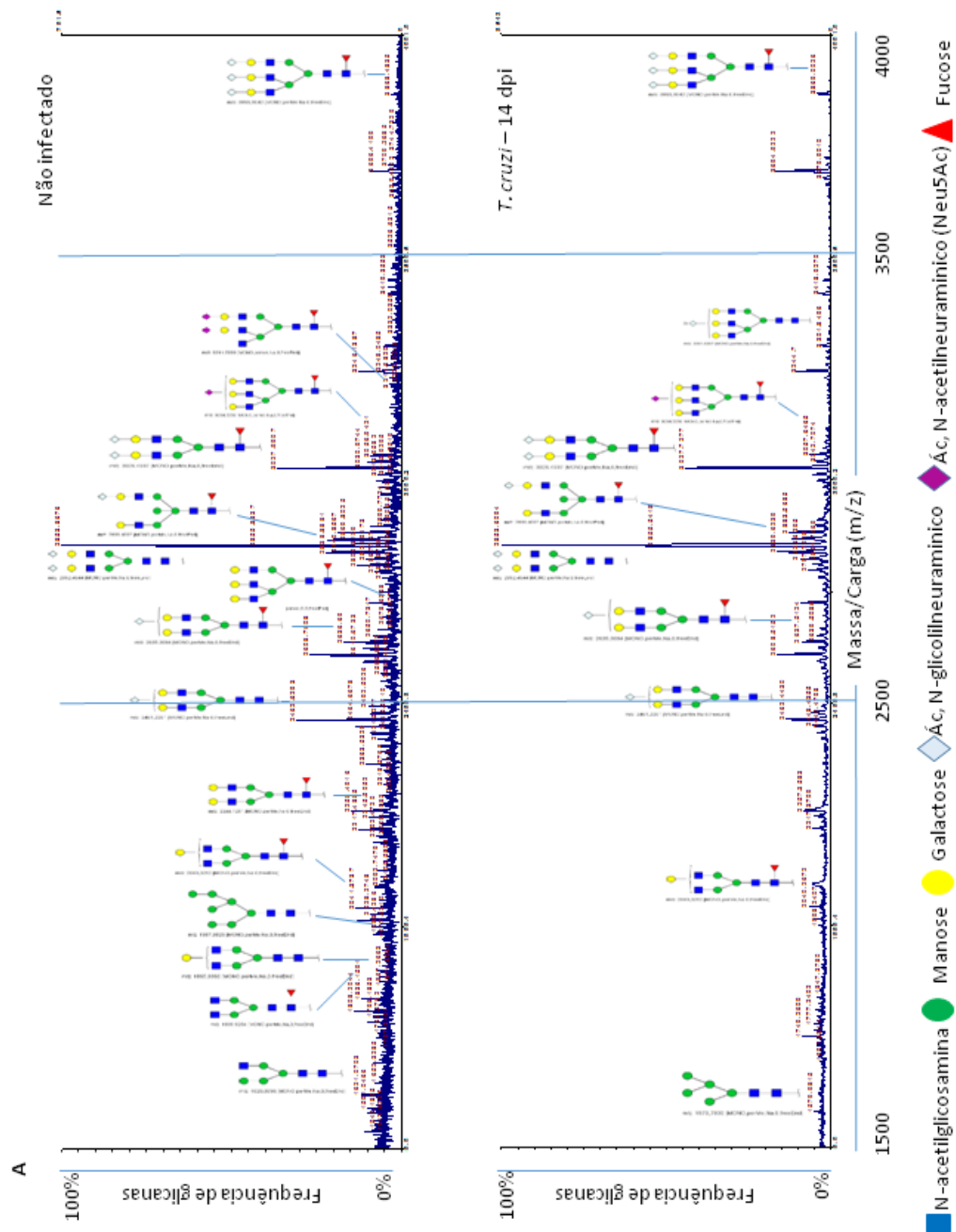
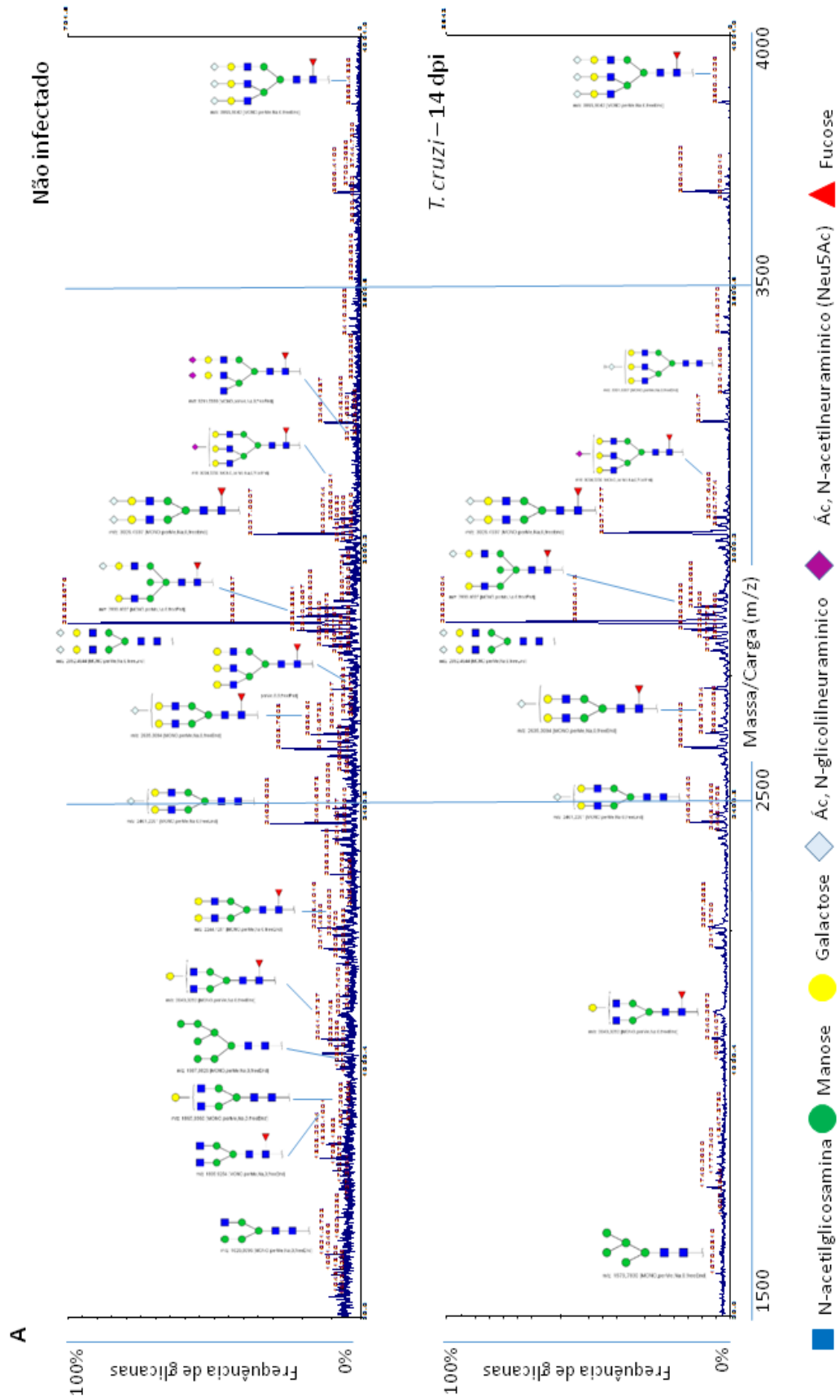
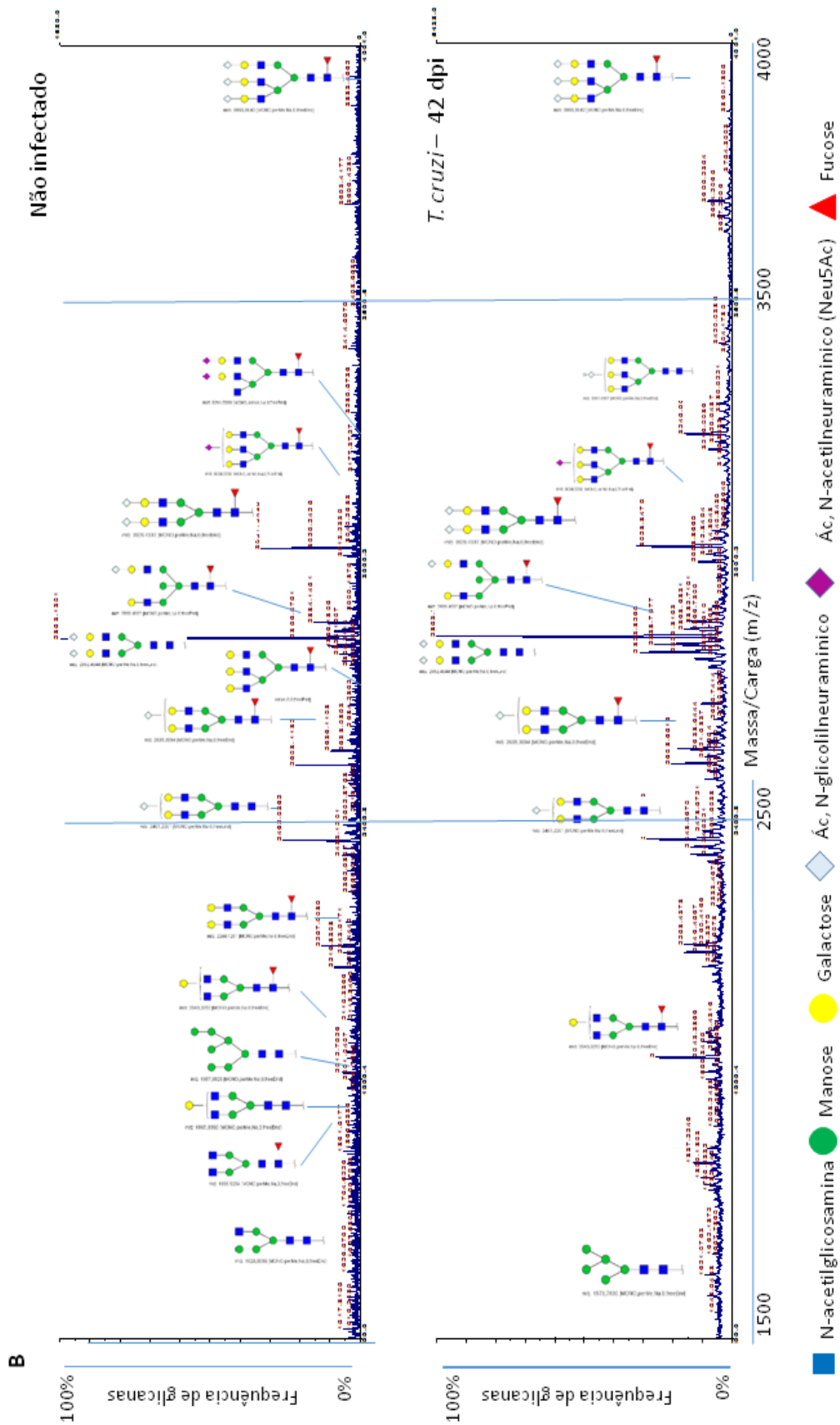
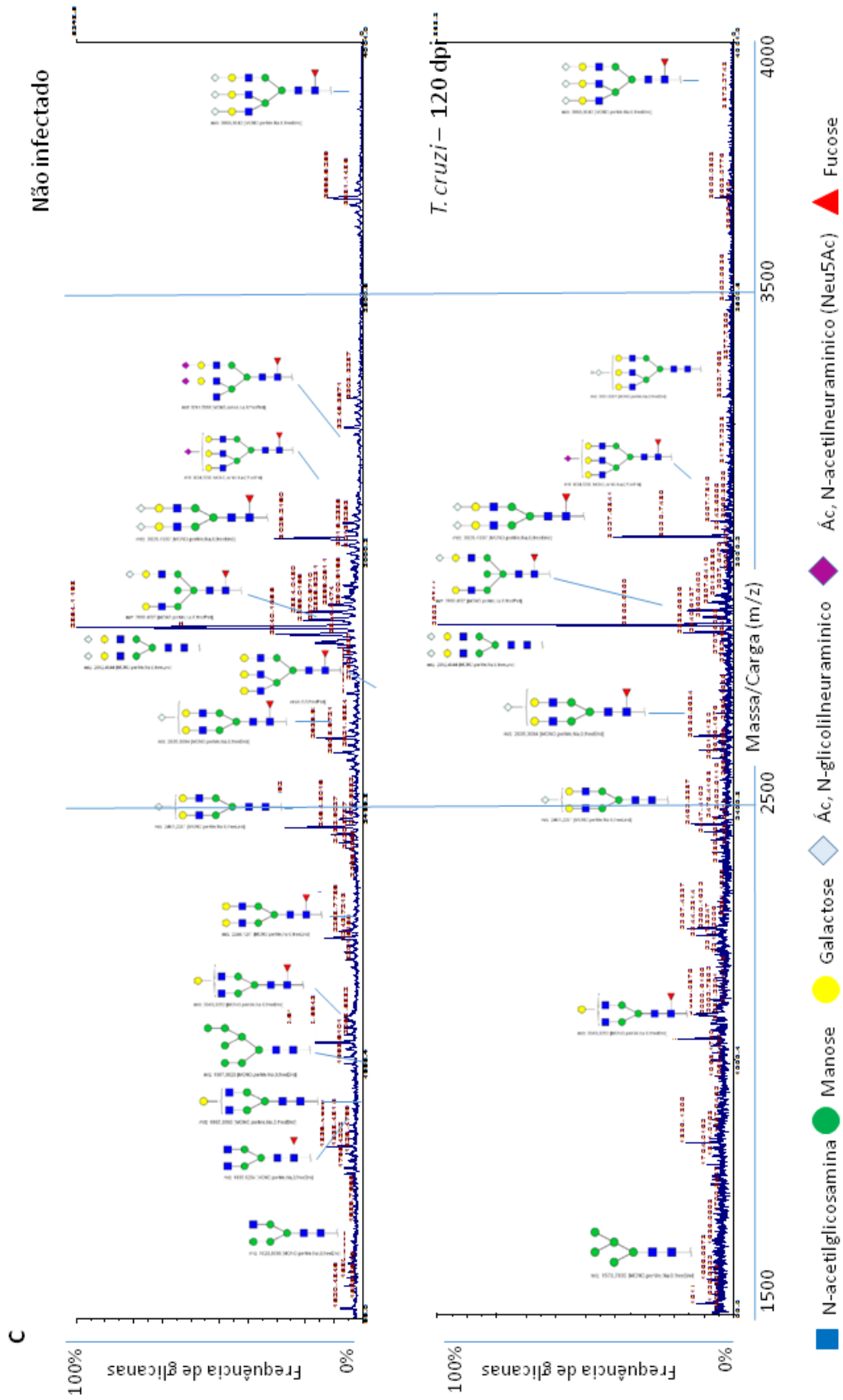


Figura 6.4: Espectro de N-glicanas de proteínas séricas de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e nos pontos indicados soros foram obtidos e analisados por espectrometria de massas tipo MALDI-TOF. São mostrados espectros representativos de pool de soros de animais infectados em diferentes momentos da infecção (A) 14 (B) 42 e (C) 120 dias pós infecção (dpi), pareados a controles não infectados de igual idade e sexo. Dados representativos de 2 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.







6.4. Perfil de ligação de lectinas no tecido cardíaco na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Inicialmente, para comprovar a existência de alterações histopatológicas já descritas na literatura (Dos Santos *et al.*, 2001), investigamos em nosso modelo, a presença da deposição de fibronectina em tecido cardíaco no curso da infecção. No tecido dos animais não infectados, detectamos discreta deposição de fibras de fibronectina (Figura 6.5). Não observamos alteração na deposição de fibronectina, no tecido cardíaco, em momento precoce da infecção (14 dpi). Contudo, detectamos aumento na deposição deste componente da matriz extracelular em 42 e 120 dpi (Figura 6.5).

Após, visando o estudo dos ligantes de lectinas em tecido, usamos cortes histológicos de baço para padronização dos ensaios. Foi possível detectar a presença da ligação de PNA, SNA e MAL em células de tecidos esplênicos criopreservados de animais não infectados e infectados (Figura 6.6). Assim, validamos o uso das lectinas como ferramentas para revelar a presença dos terminais glicosídicos em estudo no tecido cardíaco.

A análise da expressão dos ligantes para a lectina PNA revelou um padrão difuso de ligação no tecido cardíaco dos animais não infectados. Em comparação a estes, observamos diminuição na expressão de ligantes da lectina PNA em tecido cardíaco de animais infectados, em todos os pontos analisados (Figura 6.7; Figura 6.10). O estudo da expressão dos ligantes para a lectina SNA mostrou um padrão difuso no tecido dos animais não infectados, independente dos pontos analisados. Por outro lado, em animais infectados, observamos aumento da ligação da lectina SNA em fibras cardíacas e em células inflamatórias infiltrando o tecido cardíaco, em todos os pontos analisados (Figura 6.8; Figura 6.10). A análise da ligação da lectina MAL revelou a presença de seus ligantes de forma semelhante em animais não infectados e infectados, em todos os pontos analisados, com marcação em fibras e células inflamatórias infiltrando o tecido cardíaco (Figura 6.9; Figura 6.10).

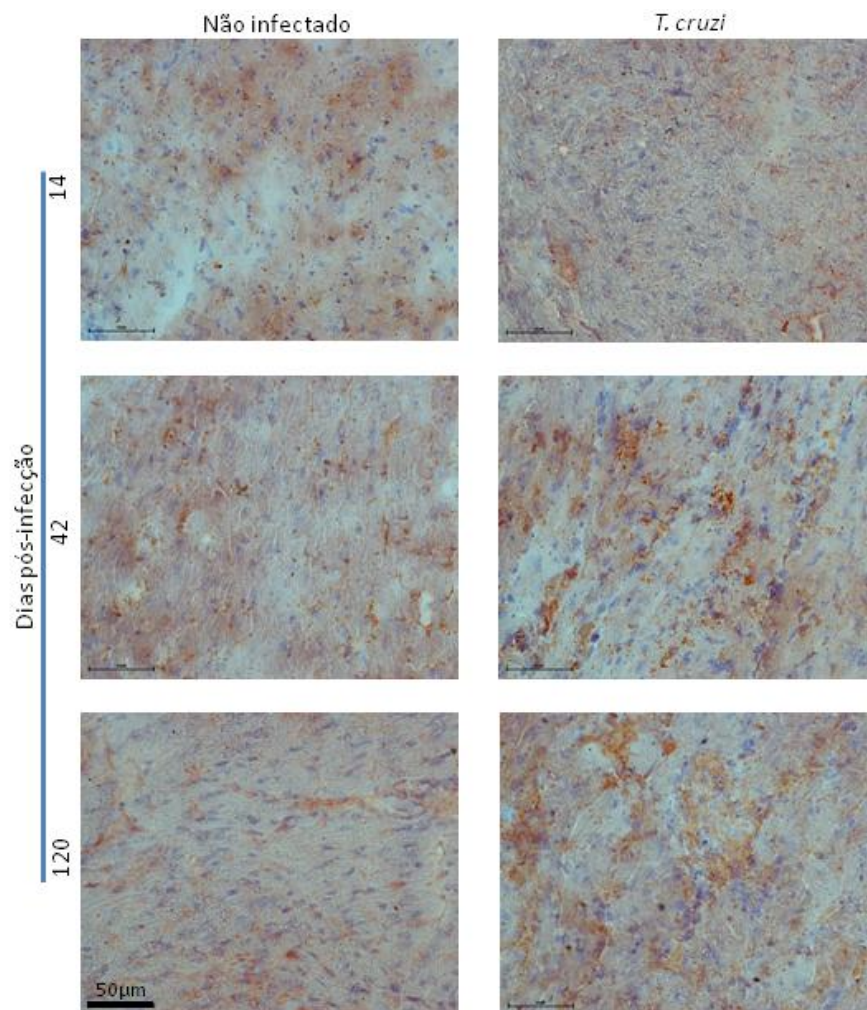


Figura 6.5: Cortes histológicos e marcação de fibronectina em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e nos pontos indicados, cortes histológicos foram feitos em criostatos e marcados para fibronectina através do ensaio de imunistoquímica. São mostradas fotos representativas de animais infectados nos pontos 14, 42 e 120 dias pós infecção (dpi), pareados a controles não infectados de igual idade e sexo. Barra, 50 µm. Dados representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

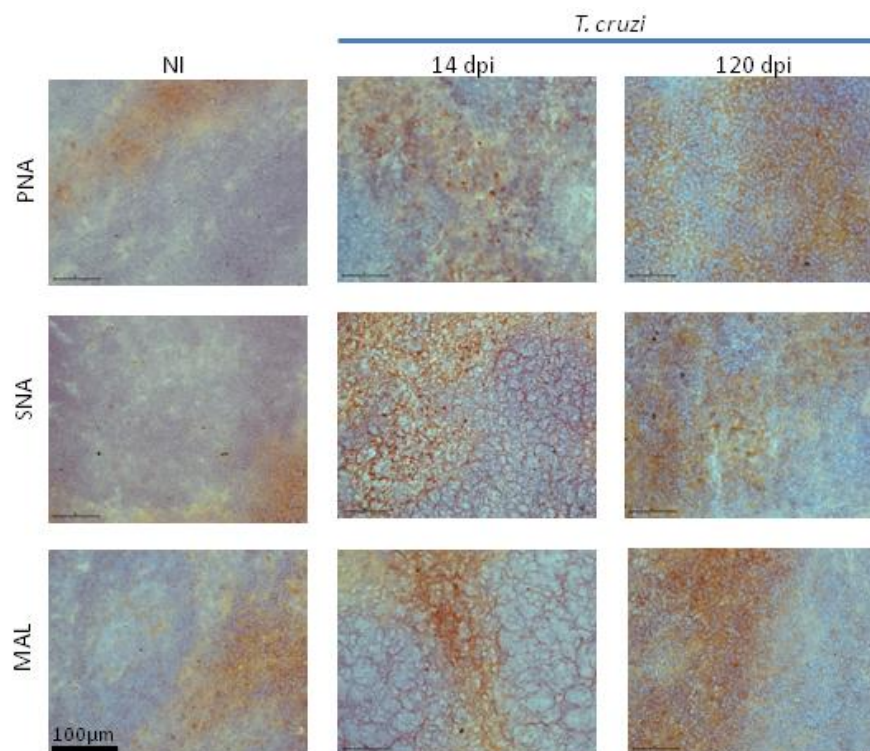


Figura 6.6: Cortes histológicos e marcação para ligantes de lectinas em baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e nos pontos indicados, cortes histológicos foram feitos em criostatos e marcados com lectinas através do ensaio de imunoistoquímica. São mostradas fotos representativas de animais infectados nos pontos 14 e 120 dias pós infecção (dpi), pareados a controles não infectados de igual idade e sexo. Barra, 100 µm. Dados representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

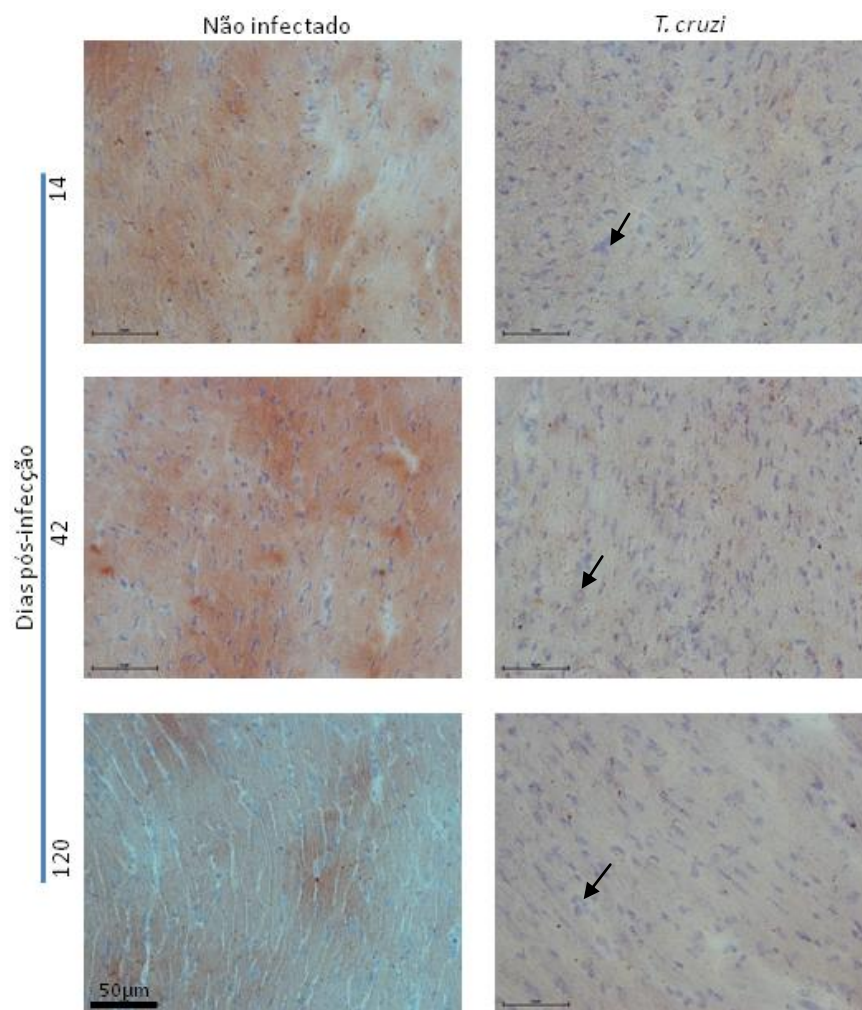


Figura 6.7: Cortes histológicos e marcação da lectina PNA em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e nos pontos indicados, cortes histológicos foram feitos em criostatos e marcados com PNA através do ensaio de imunohistoquímica. São mostradas fotos representativas de animais infectados nos pontos 14, 42 e 120 dias pós infecção (dpi), pareados a controles não infectados de igual idade e sexo. Barra, 50 µm. Dados representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

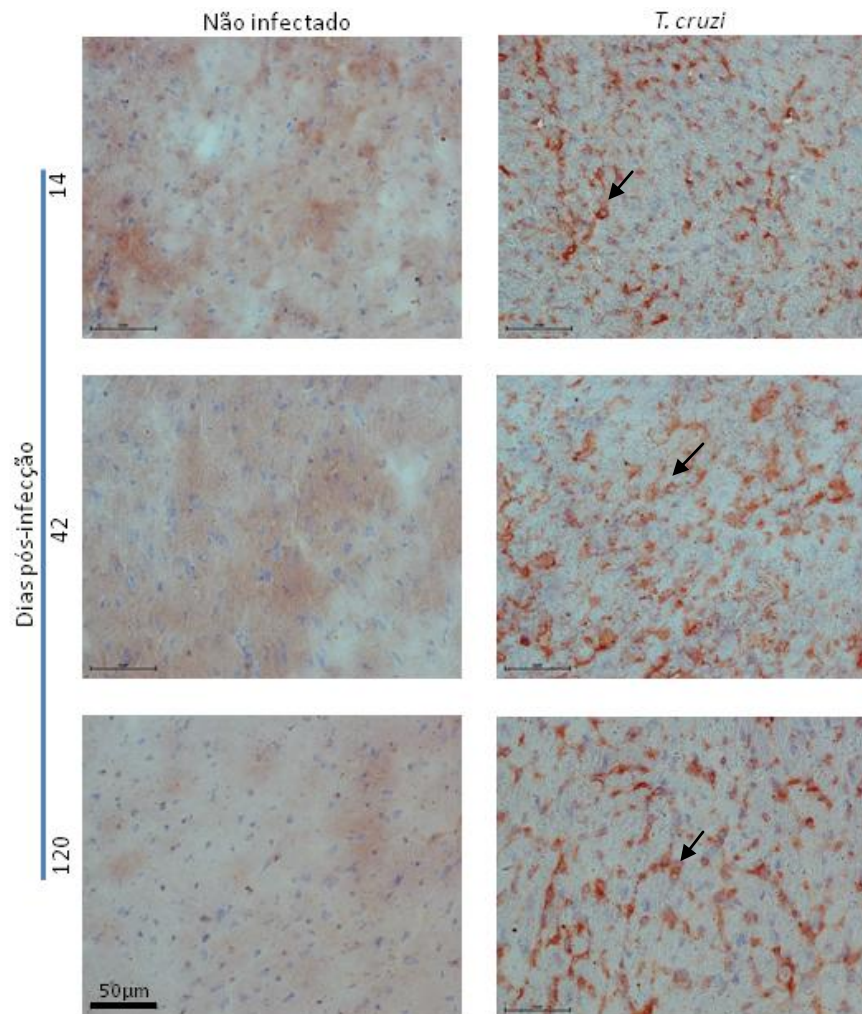


Figura 6.8: Cortes histológicos e marcação da lectina SNA em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e nos pontos indicados, cortes histológicos foram feitos em criostatos e marcados com SNA através do ensaio de imunistoquímica. São mostradas fotos representativas de animais infectados nos pontos 14, 42 e 120 dias pós infecção (dpi), pareados a controles não infectados de igual idade e sexo. Barra, 50 µm. Dados representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

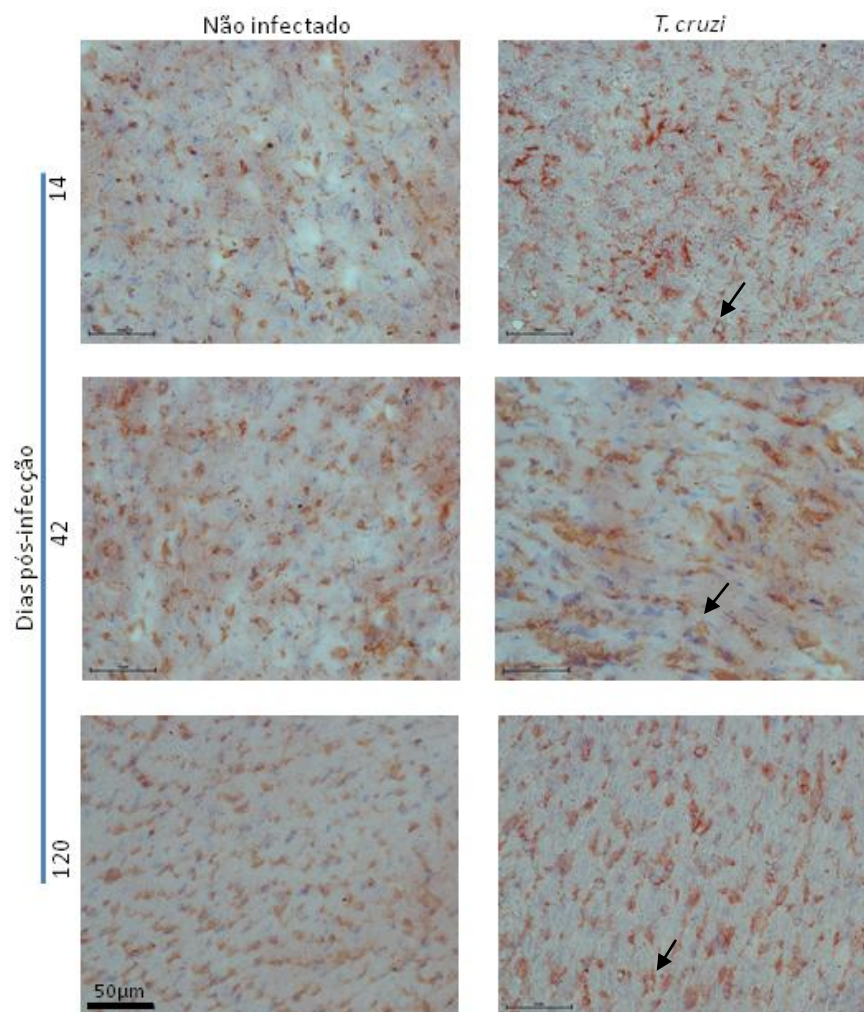


Figura 6.9: Cortes histológicos e marcação da lectina MAL em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e nos pontos indicados, cortes histológicos foram feitos em criostatos e marcados com MAL através do ensaio de imunistoquímica. São mostradas fotos representativas de animais infectados nos pontos 14, 42 e 120 dias pós infecção (dpi), pareados a controles não infectados de igual idade e sexo. Barra, 50 µm. Dados representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

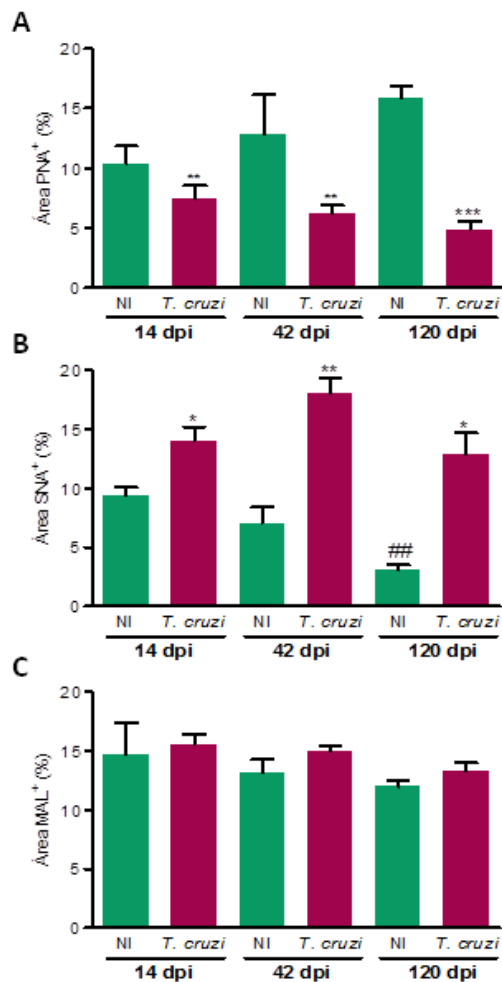


Figura 6.10: Análise quantitativa da marcação de lectinas em tecido cardíaco de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue e nos pontos indicados, cortes histológicos foram feitos em criostatos e marcados com (A) PNA, (B) SNA e (C) MAL através do ensaio de imunistoquímica. As imagens de seções de tecidos foram analisadas pelo programa NIS-Elements (Nikon-Japão). Dados mostram média \pm desvio padrão. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ###, $p < 0,01$; comparação do NI (14) com NI (120) Gráficos representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.5. Frequência de células T esplênicas durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Antes de analisarmos o perfil glicosídico das células T CD8⁺, investigamos o percentual de células T em tecido esplênico nos diferentes momentos de infecção. Inicialmente, mostramos a sequência de análise e *dot plots* representativos para obtenção das populações de células T CD8⁺ e CD4⁺. *Doublets* foram excluídos e *singlets* selecionados (R1), a análise do volume e granularidade celular (FS-linear x SS-linear) permitiu a seleção de células viáveis (R2). Estas foram analisadas quanto a presença das moléculas em estudo (Figura 6.11). Na Figura 6.12A mostramos a redução da frequência de células CD3⁺CD8⁺ na fase aguda da infecção (14 e 42 dpi) em relação aos animais não infectados. Na fase crônica (120 dpi), os percentuais de células CD3⁺CD8⁺ foram semelhantes em animais não infectados e infectados, pareados por idade e sexo (Figura 6.12A). Nos diversos pontos analisados, as proporções de células CD3⁺CD4⁺ no baço de animais infectados foram semelhantes àquelas encontradas em animais não infectados (Figura 6.12B). Por outro lado, observamos aumento na frequência de células T duplo-positivas CD8⁺CD4⁺ nos animais infectados em relação aos seus controles (Figura 6.12C).

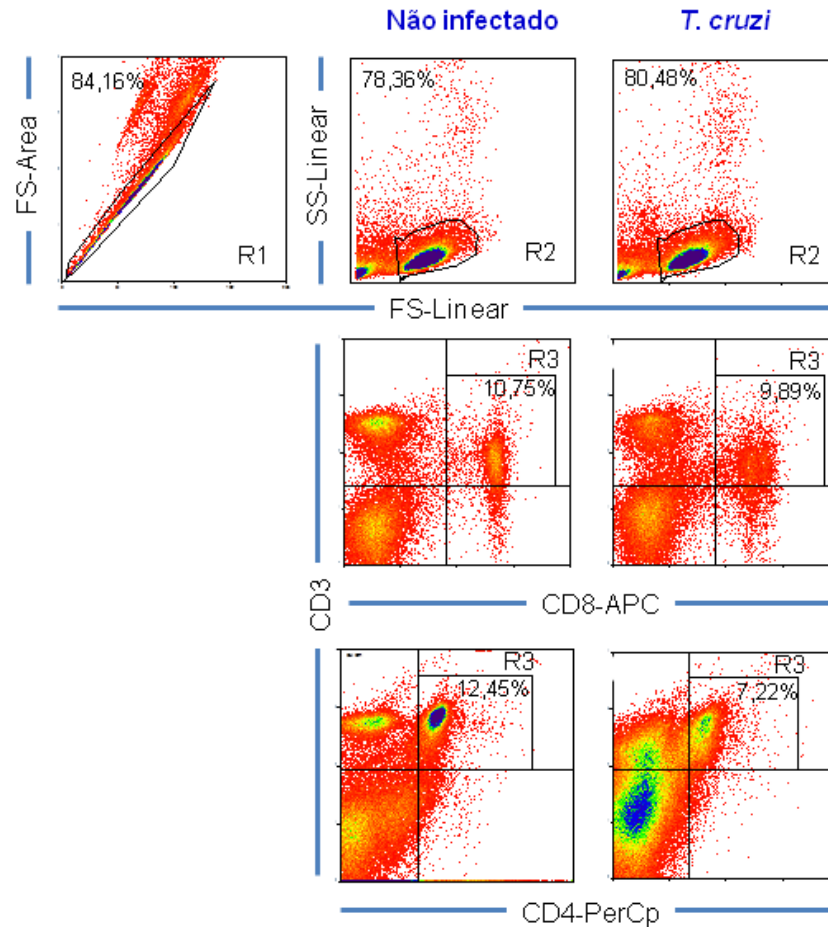


Figura 6.11: Sequência representativa da análise de citometria de fluxo de amostras de células de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas e marcadas com anticorpos específicos para as moléculas em estudo, adquiridas em citômetro (Beckman Coulter CyAn 7 Color) e analisadas utilizando o programa Summit 4.3. *Singlets* foram selecionados (FS-Linear x FS-Area; R1), analisados quanto à viabilidade e ao tamanho e granularidade (FS-Linear x SS-Linear; R2). A sequência dos *gates* subsequentes foram feitas para análise das populações em estudo, como exemplo, CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD4⁺. *Dot plots* obtidos em análises de amostras de 14 dias pós infecção e representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

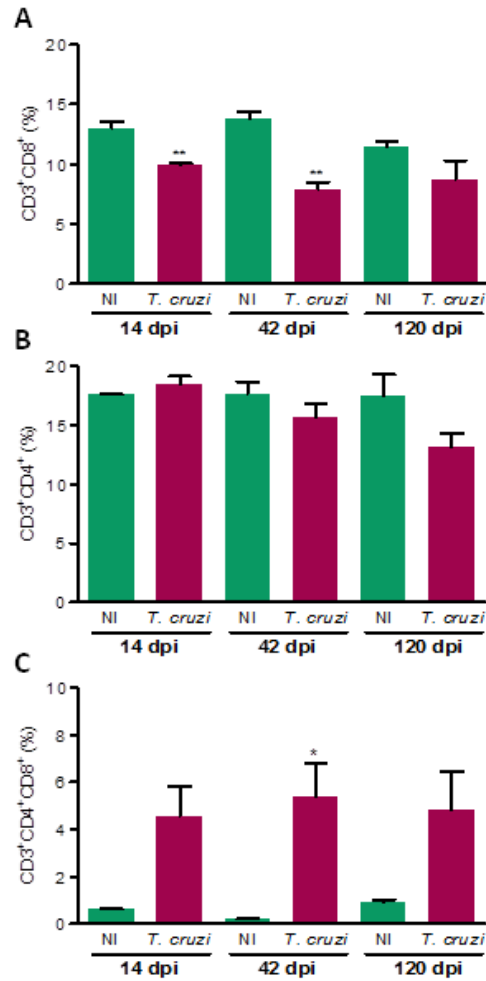


Figura 6.12: Frequência de células T em baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas e marcadas com anticorpos específicos. Processamento descrito na Figura 6.X. Os gráficos mostram a frequência de células (A) $CD3^+CD8^+$, (B) $CD3^+CD4^+$ e (C) $CD3^+CD8^+CD4^+$ no baço dos animais não infectados (NI) ou infectados (Tc) nos diferentes pontos de análise. Dados mostram média \pm desvio padrão. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. Gráficos representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.6. Frequência de células esplênicas que expressam ligantes para lectinas durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Nosso próximo passo foi estudar se a infecção pelo *T. cruzi* leva a alterações na expressão de ligantes para lectinas em células do baço. Três tipos de lectinas foram usadas como ferramentas para determinar presença ou ausência de terminais siálicos em células esplênicas totais: PNA, SNA e MAL. Primeiramente, mostramos a sequência de análise e *dot plots* representativos para obtenção das populações de células esplênicas (Figura 6.13A). Em histogramas mostramos o perfil de expressão das três lectinas em células totais (Figura 6.13B). A análise da frequência de células que expressam ligantes para lectina PNA, mostrou um aumento na proporção da subpopulação que apresenta maior densidade dessas moléculas em sua superfície em animais infectados quando comparados a animais não infectados (Figura 6.13C). Por outro lado, observamos diminuição na proporção de células que expressam ligantes para a lectina SNA (Figura 6.13D) e nenhuma modificação foi observada no percentual das células esplênicas que expressam ligantes para a lectina MAL (Figura 6.13E).

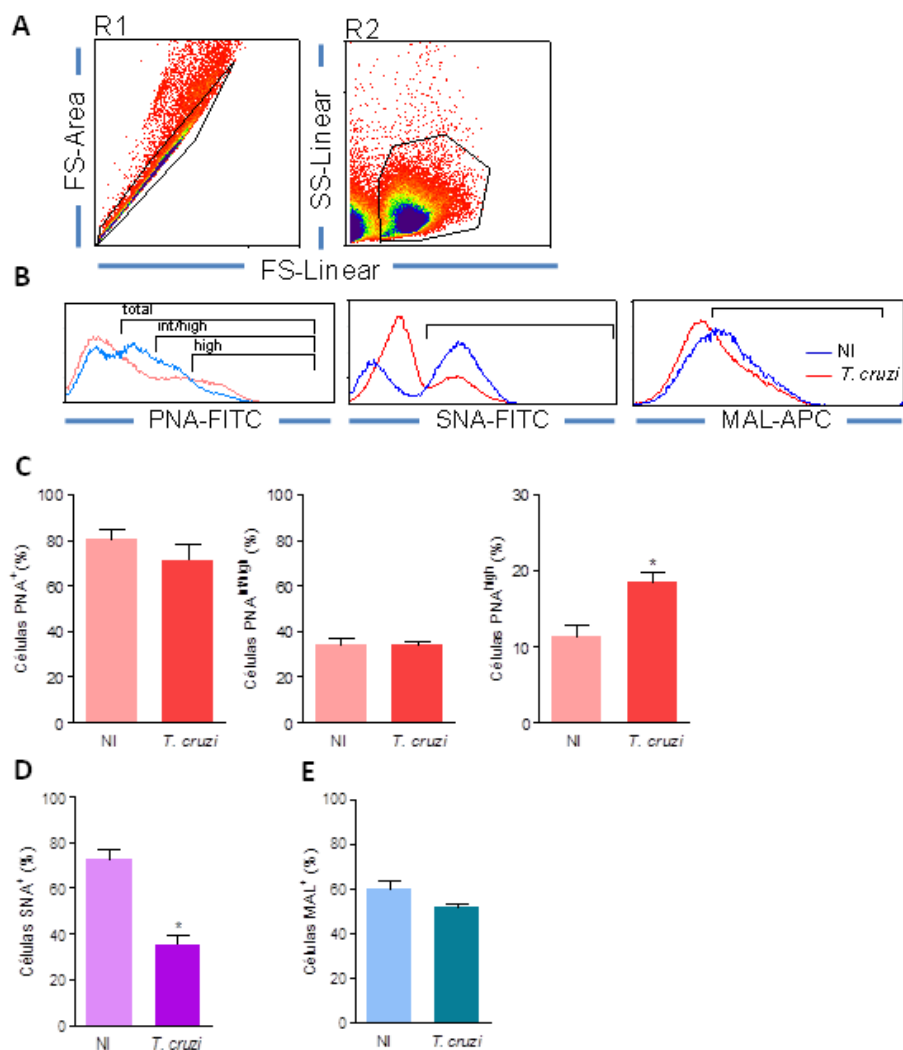


Figura 6.13: Expressão de ligantes de lectinas em células de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas em 120 dpi e marcadas com lectinas conjugadas a fluorocromos. (A) *Dot plot* de células *singlets* e viáveis (R1 e R2). (B) Histogramas mostram o padrão de expressão dos ligantes para as lectinas PNA, SNA e MAL em células totais do baço de animais não infectados (azul) ou infectados pelo *T. cruzi* (vermelho). Frequências de células totais (C) PNA⁺, (D) SNA⁺ e (E) MAL⁺. Dados mostram média ± desvio padrão. *, p < 0,05. Dados representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.7. Perfil de glicosilação de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* revelados pela ligação das lectinas PNA, SNA e MAL

Para determinar se a infecção pelo *T. cruzi* resulta em alterações glicosídicas em terminais possíveis de ação para TS, investigamos a expressão de ligantes para as lectinas PNA, SNA e MAL em células T (CD3⁺) CD8⁺, CD4⁺ e CD8⁺CD4⁺ de baço (Figura 6.14A). Os histogramas representativos da análise da expressão dos ligantes das lectinas em subpopulações de células T, mostram que há uma diferença no padrão da frequência dessas células entre animais não infectados e infectados (Figura 6.14B-D).

Quando analisamos a frequência de subpopulações de células T que expressam ligantes para as lectinas estudadas, observamos diminuição significativa no percentual de células SNA⁺ em todas as subpopulações de células T em animais infectados, quando comparadas às células de animais não infectados (Figura 6.15A). Ao analisarmos o perfil glicosídico em subpopulações celulares com densidades para expressão intermediária (*int*) e alta (*high*) de ligantes destas lectinas, detectamos aumento na frequência de células CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD4⁺ que expressam altas densidades de ligantes para a lectina PNA. Também, observamos diminuição no percentual de células CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺CD4⁺ que expressam altas densidades de ligantes para a lectina SNA. Ao analisarmos a expressão de ligantes para lectina MAL, observamos diminuição da proporção de células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺CD4⁺ (Figura 6.15B).

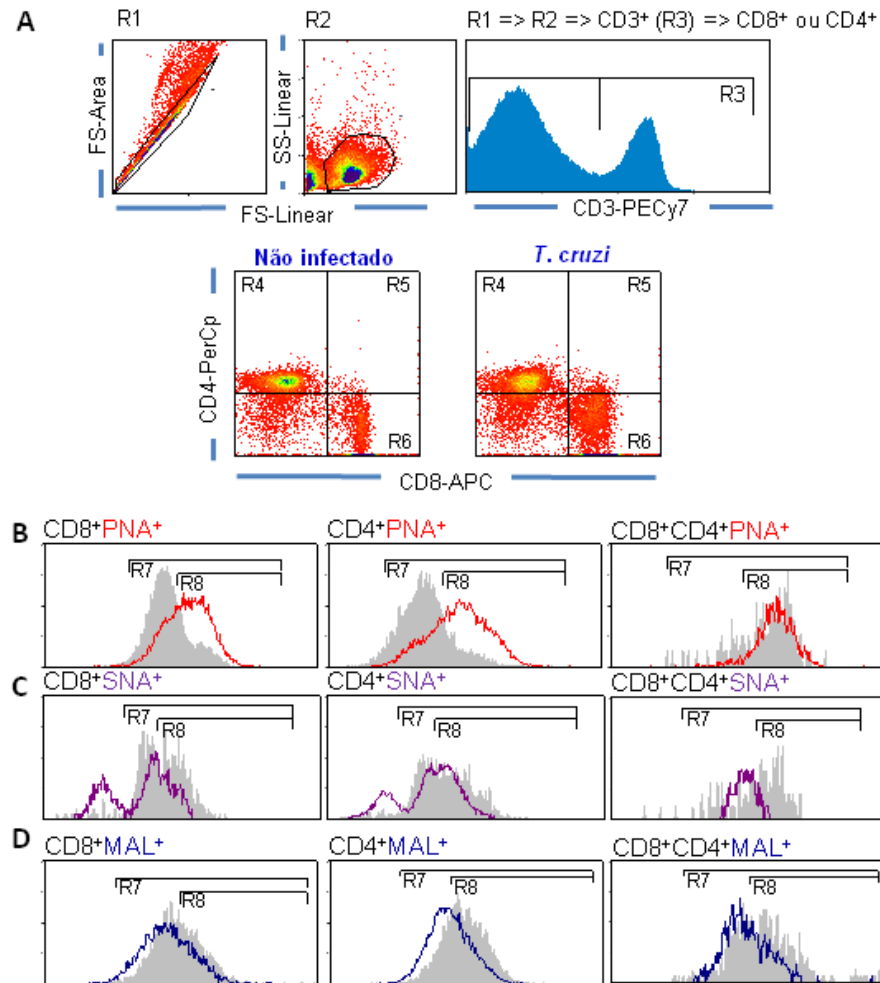


Figura 6.14: Padrão representativo da expressão de ligantes de lectinas em subpopulações de células T de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas em 120 dpi e marcadas com anticorpos específicos. (A) *Singlets* foram selecionados (FS-Linear x FS-Area; R1), analisados quanto à viabilidade e ao tamanho e granularidade (FS-Linear x SS-Linear; R2). A sequência dos *gates* subsequentes foram feitas para análise das populações em estudo: CD3⁺ (R3), CD4⁺ (R4), CD8⁺CD4⁺ (R5) e CD8⁺ (R6). Os histogramas mostram o padrão de expressão dos ligantes para as lectinas (B) PNA, (C) SNA e (D) MAL em células CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺CD4⁺ do baço de animais não infectados (cinza) ou infectados pelo *T. cruzi* (linha colorida). Dados representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

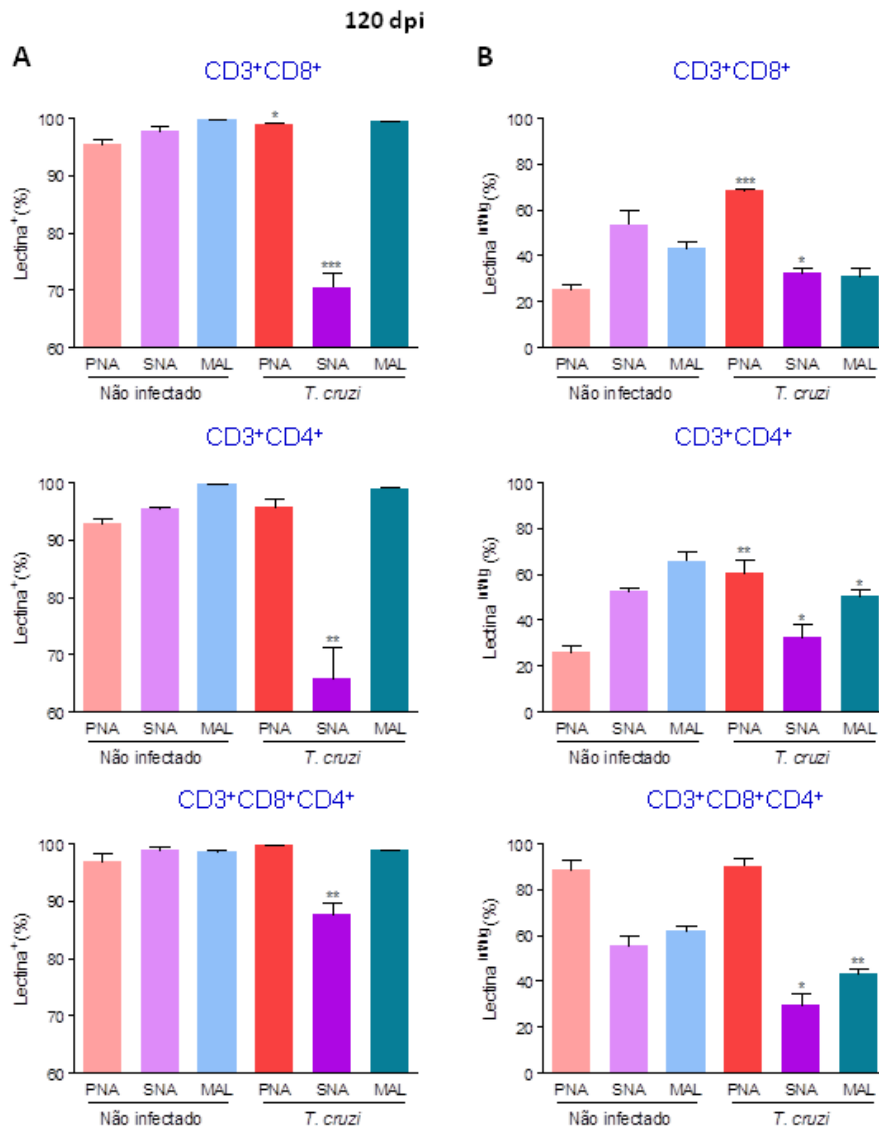


Figura 6.15: Frequência de células expressando ligantes de lectinas em subpopulações de células T de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Dados obtidos a partir dos histogramas descritos na Figura 6.15, mostrando (A) células totais (R7) e células expressando densidades intermediárias (int) e/ou altas (*high*) dos ligantes de lectinas (R8) em células CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺CD4⁺ do baço de animais não infectados ou infectados pelo *T. cruzi*. Dados mostram média ± desvio padrão. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Gráficos representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.8. Expressão de CD43 e ligantes para lectina PNA em linfócitos T durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Conforme mostrado na Figura 16A, observamos um aumento na frequência de células CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD4⁺ que expressam simultaneamente CD43^{Neu5Ac} e ligantes para a lectina PNA em animais infectados, em comparação a animais não infectados pareados por idade e sexo. Este aumento foi observado a partir do pico de parasitemia (42 dpi) e persistiu na fase crônica da infecção (120 dpi). Perfil semelhante de alteração da frequência de células CD43^{Neu5Ac}PNA⁺ em animais infectados foi observado em células CD3⁺CD4⁺ (Figura 16B).

Observamos também aumento na densidade de moléculas que ligam para a lectina PNA e de CD43^{Neu5Ac} na superfície de células T nas fases aguda (42 dpi) e crônica (120 dpi) da infecção (Figura 16C e D). Aumento na densidade de ligantes para PNA e de CD43^{Neu5Ac} na superfície das células T foi detectado em animais não infectados envelhecidos, controles de 120 dpi, em relação aos animais mais jovens, controles de 42 dpi, (Figura 16C e D).

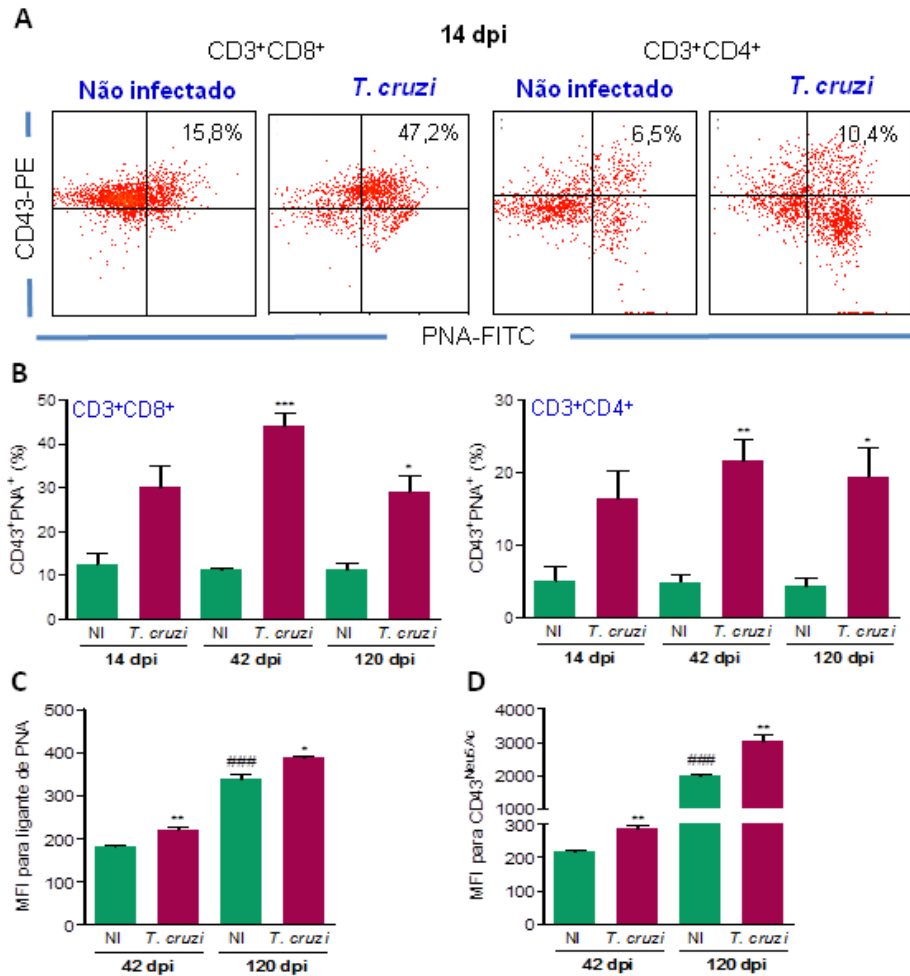


Figura 6.16: Percentual de células CD43⁺PNA⁺ e densidade de moléculas ligantes de PNA e de CD43 em células T de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células esplênicas foram obtidas e marcadas para as moléculas em estudo. (A) *Dot plot* representativo (B) Frequência de células CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD4⁺ que são CD43⁺ e expressam ligantes para a lectina PNA. (C) Densidade de moléculas com ligantes para a lectina PNA na superfície de linfócitos T. (D) Densidade de moléculas CD43^{Neu5Ac} na superfície de linfócitos T. Dados mostram média ± desvio padrão. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ####, p < 0,001. Gráficos representativos de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.9. Perfil de ativação de linfócitos T CD8⁺ que expressam ligantes para a lectina PNA durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

No tecido cardíaco de pacientes e camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* a população majoritária é constituída por células T CD8⁺ (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Dos Santos *et al.*, 2001). Este enriquecimento em células CD8⁺ no tecido cardíaco é associado à presença diferencial de moléculas que marcam ativação e capacidade de migração das células T CD8⁺ presentes em tecidos periféricos, sangue e baço (Dos Santos *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2015). Diante dos nossos dados mostrando ausência de células mononucleares PNA⁺ infiltrando o tecido cardíaco dos animais infectados, investigamos se as células PNA⁺ presentes em baço apresentavam perfis de ativação, migração e funcionalidade.

Corroborando dados da literatura (Grisotto *et al.*, 2001), observamos que os animais infectados pelo *T. cruzi* apresentaram menor frequência de células esplênicas *naïve* (CD44⁻CD62L⁺) quando comparados aos animais não infectados (Figura 6.17A e B). De modo contrário, os animais infectados apresentaram uma maior frequência de células com perfil ativado (CD44⁺CD62L⁻) em todos os pontos analisados (Figura 6.17B). Com o intuito de buscar se as células T CD8⁺PNA⁺ apresentam alteração no perfil de ativação celular, analisamos a frequência de células *naïve* e ativadas nesta população (Figura 6.18A). Independente do *status* de infecção, existe predomínio de células CD44⁺CD62L⁻ em células CD8⁺PNA⁺ (Figura 6.18B). Contudo, observamos em animais não infectados uma relação *naïve* : ativada de ~1:5 células, enquanto nos animais infectados esta relação é de 1:10-20 células, mostrando enriquecimento de células CD8⁺PNA⁺ ativadas em animais infectados.

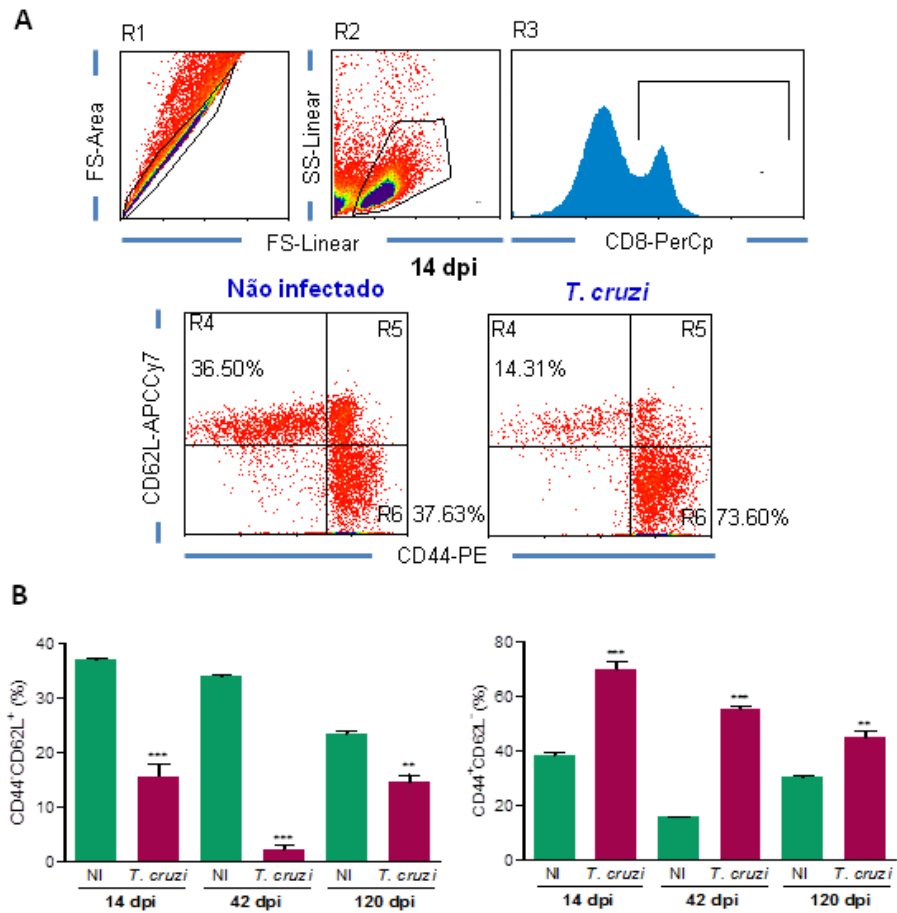


Figura 6.17: Expressão de CD44 e CD62L em células CD8⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas e marcadas com anticorpos específicos para as moléculas em estudo. (A) Sequência representativa da obtenção de *gates* para análise dos dados. *Singlets* foram selecionados (FS-Linear x FS-Area; R1), analisados quanto à viabilidade e ao tamanho e granularidade (FS-Linear x SS-Linear; R2). O histograma mostra a seleção da população CD8⁺ (R3), e os *dot plots* para identificação das subpopulações CD44⁻CD62L⁺ (R4), CD44⁺CD62L⁺ (R5) e CD44⁺CD62L⁻ (R6). Dados mostram média \pm desvio padrão. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Gráficos representativos obtidos em análises de amostras de 14 dias pós infecção (dpi) e de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

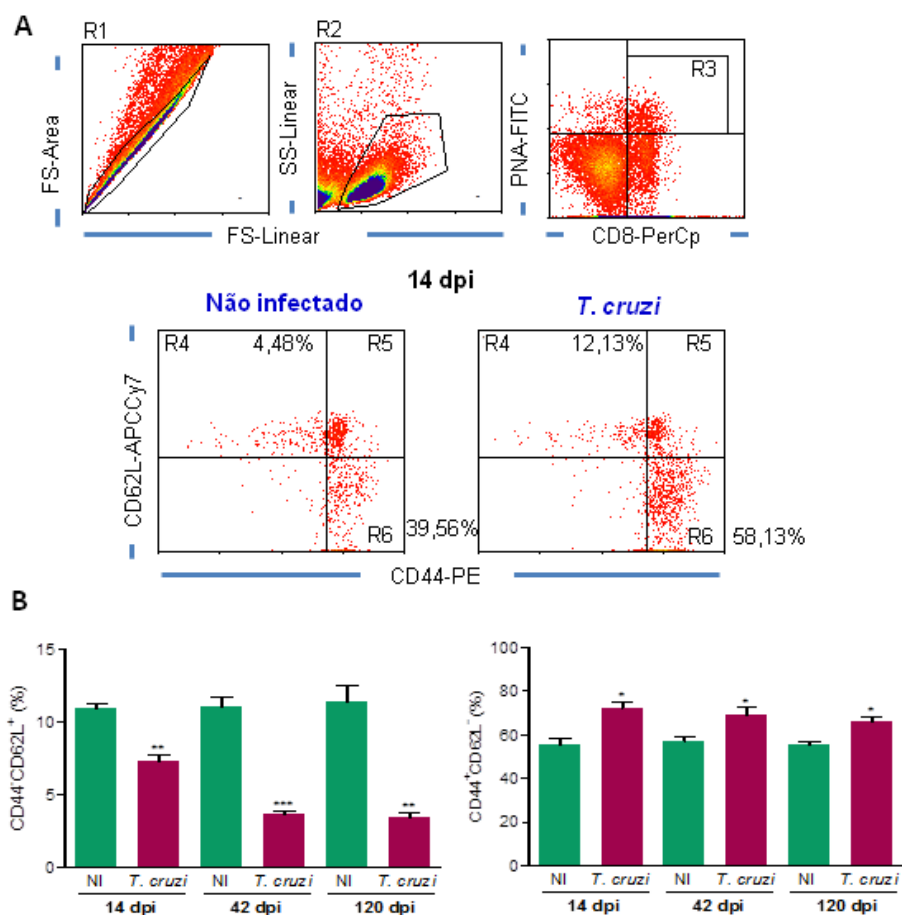


Figura 6.18: Expressão de CD44 e CD62L em células CD8⁺PNA⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas e marcadas com anticorpos específicos para as moléculas em estudo. (A) Sequência representativa da obtenção de *gates* para análise dos dados. *Singlets* foram selecionados (FS-Linear x FS-Area; R1), analisados quanto à viabilidade e ao tamanho e granularidade (FS-Linear x SS-Linear; R2). Os *dot plots* mostram a seleção da população CD8⁺PNA⁺ (R3) para identificação das subpopulações CD62L⁺CD44⁻ (R4), CD62L⁺CD44⁺ (R5) e CD62L⁻CD44⁺ (R6). Dados mostram média \pm desvio padrão. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Gráficos representativos obtidos em análises de amostras de 14 dias pós infecção (dpi) e de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.10. Perfil de migração de linfócitos T CD8⁺ que expressam ligantes para a lectina PNA durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Durante processos inflamatórios, células do sistema imune passam a expressar em sua superfície moléculas de adesão celular e receptores de quimiocinas que permitem essas células chegarem ao local da lesão e lá desempenharem seu papel biológico, dentre essas moléculas estão LFA-1, CCR5 e o CCR1 (Muller, 2015). Na fase aguda da infecção (14 e 42 dpi), observamos aumento na frequência de células CD8⁺ que são LFA-1⁺CCR5⁺ e LFA-1⁺CCR1⁺ em comparação aos percentuais encontrados em animais não infectados (Figura 6.19A e B). De forma semelhante, observamos aumento na frequência de células CD8⁺PNA⁺ que são LFA-1⁺CCR5⁺ em 14 e 42 dpi. Observamos aumento na frequência de células CD8⁺PNA⁺ que são LFA-1⁺CCR1⁺ restrito a 42 dpi (Figura 6.20A e B). Assim, mostramos que células CD8⁺PNA⁺ expressam moléculas de adesão celular e receptores de quimiocinas que, potencialmente, as capacitam de migrar.

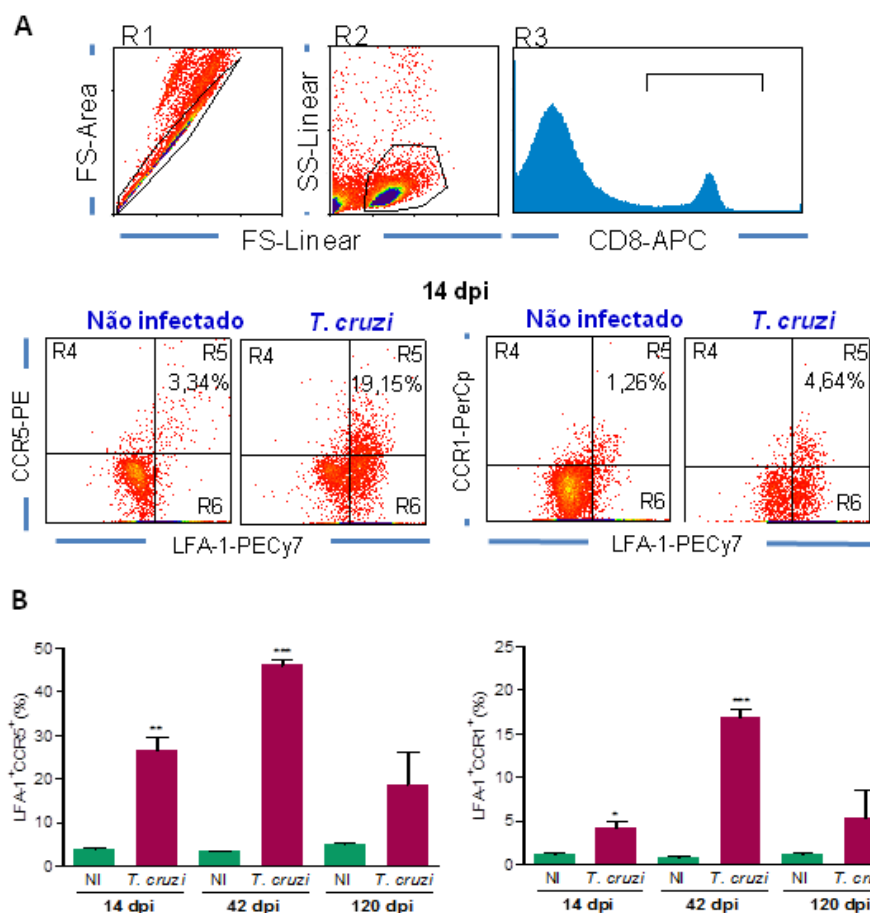


Figura 6.19: Expressão de LFA-1 e CCR5/CCR1 em células CD8⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas e marcadas com anticorpos específicos para as moléculas em estudo. (A) Sequência representativa da obtenção de *gates* para análise dos dados. *Singlets* foram selecionados (FS-Linear x FS-Area; R1), analisados quanto à viabilidade e ao tamanho e granularidade (FS-Linear x SS-Linear; R2). O histograma mostra a seleção da população CD8⁺ (R3), e os *dot plots* para identificação das subpopulações CCR5⁺/CCR1⁺ (R4), LFA-1⁺CCR5⁺/LFA-1⁺CCR1⁺ (R5) e LFA-1⁺ (R6). Dados mostram média ± desvio padrão. *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. Gráficos representativos obtidos em análises de amostras de 14 dias pós infecção (dpi) e de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

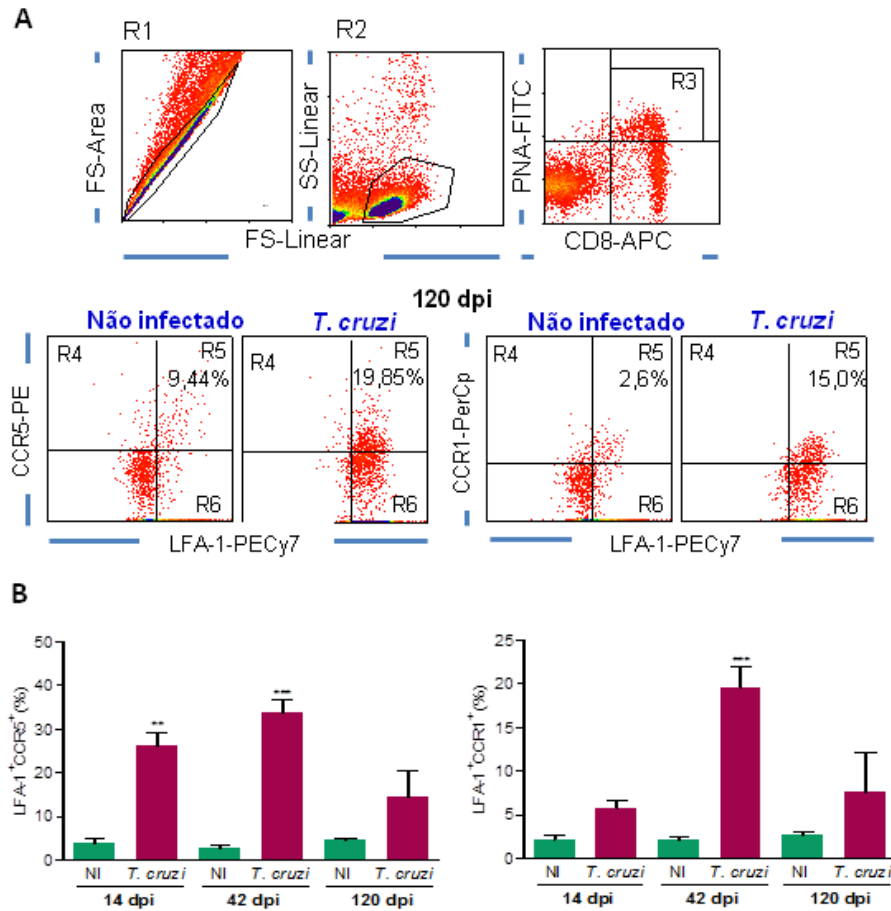


Figura 6.20: Expressão de LFA-1 e CCR5/CCR1 em células CD8⁺PNA⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas e marcadas para as moléculas em estudo. (A) Sequência representativa da obtenção de *gates* para análise dos dados. *Singlets* foram selecionados (FS-Linear x FS-Area; R1), analisados quanto à viabilidade e ao tamanho e granularidade (FS-Linear x SS-Linear; R2). Os *dot plots* mostram a seleção da população CD8⁺PNA⁺ (R3) para identificação das subpopulações CCR5⁺/CCR1⁺ (R4), LFA-1⁺CCR5⁺/LFA-1⁺CCR1⁺ (R5) e LFA-1⁺ (R6). Dados mostram média \pm desvio padrão. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Gráficos representativos obtidos em análises de amostras de 120 dias pós infecção (dpi) e de 3 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

6.11. Perfil funcional de linfócitos T CD8⁺ que expressam ligantes para a lectina PNA durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Para determinar se células T CD8⁺ funcionalmente segregadas (Silverio *et al.*, 2012) apresentam perfil glicosídico diferenciado, investigamos a expressão de IFN γ e/ou Pfn neste tipo celular. Inicialmente, mostramos a sequência de análise e *dot plots* representativos para obtenção das populações de células CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺. *Doublets* foram excluídos e *singlets* selecionados (R1), a análise do tamanho e granularidade celular (FS-linear x SS-linear) permitiu a seleção de células viáveis (R2). Estas foram analisadas quanto à presença das moléculas em estudo (Figura 6.21A e B).

A análise da frequência de células CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺, em baço de camundongos C57BL/6 infectados pelo *T. cruzi*, mostrou que não há alteração das frequências de células Pfn⁺ e IFN γ ⁺Pfn⁺ (Figura 6.22A e B), quando comparados a animais não infectados. Porém, observamos enriquecimento significativo em células expressando IFN γ nas populações de células CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺ no baço dos animais infectados (120 dpi), em relação aos não infectados (Figura 6.22A e B).

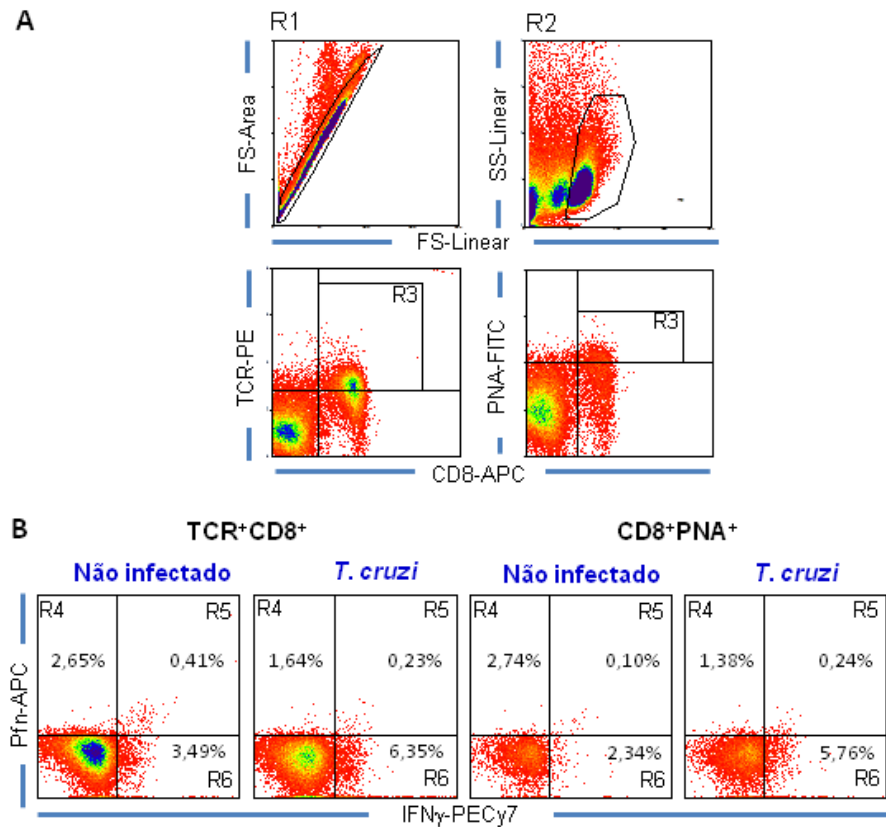


Figura 6.21: Sequência representativa da obtenção de *gates* para análise do padrão de funcionalidade de células CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺ de baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Camundongos foram infectados com 100 formas tripomastigotas de sangue, células foram obtidas e marcadas para as moléculas em estudo. (A) Sequência representativa da obtenção de *gates* para análise dos dados. *Singlets* foram selecionados (FS-Linear x FS-Area; R1), analisados quanto à viabilidade e ao tamanho e granularidade (FS-Linear x SS-Linear; R2). Os *dot plots* mostram a seleção das subpopulações CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺ (R3). (B) *Dot plots* para identificação das subpopulações de células T CD8 que expressam perfil de funcionalidade Pfn⁺ (R4), IFN γ ⁺Pfn⁺ (R5) e IFN γ ⁺ (R6). Dados representativos obtidos em análises de amostras de 14 dias pós infecção (dpi) e de 2 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

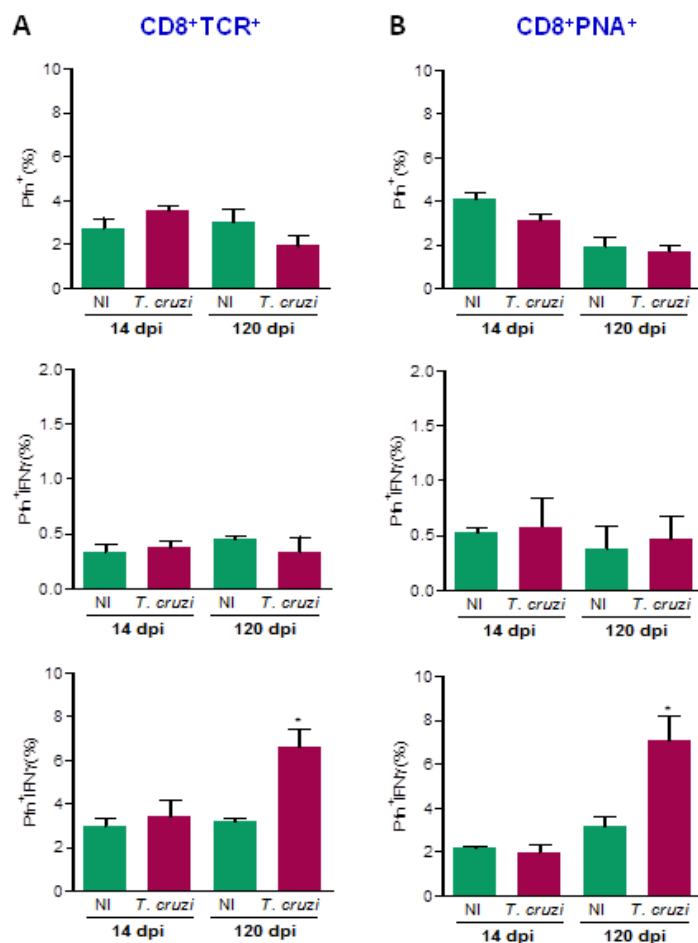


Figura 6.22: Frequência de células CD8⁺TCR⁺ e CD8⁺PNA⁺ com perfil funcional Pfn⁺, IFNγ⁺Pfn⁺ ou IFNγ⁺ em baço de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Dados obtidos a partir dos histogramas descritos na Figura 6.21, mostrando (A) frequência de células CD8⁺TCR⁺ que expressam perfis funcionais Pfn⁺, IFNγ⁺Pfn⁺ ou IFNγ⁺ e (B) células CD8⁺PNA⁺ expressando perfis funcionais Pfn⁺, IFNγ⁺Pfn⁺ ou IFNγ⁺ do baço de animais não infectados ou infectados pelo *T. cruzi*. Gráficos representativos de 2 experimentos com grupos formados por 3-4 animais não infectados (NI) e 3-5 animais infectados pelo *T. cruzi*.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos associar perfis diferenciados de glicosilação em proteínas séricas, tecido cardíaco e células T com o quadro clínico, utilizando o modelo da DC experimental em camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. Observamos alterações elétricas (como bradicardia e aumento do intervalo QTc) já estabelecidas em 42 dpi, que persistem na fase crônica. Não achamos diferenças qualitativas e quantitativas em N-glicanas de proteínas séricas na fase aguda ou crônica da infecção. O estudo dos perfis de glicosilação em tecido cardíaco utilizando as lectinas PNA, SNA e MAL revelou, respectivamente, redução, aumento e não alteração no padrão da expressão de seus ligantes na fase aguda e crônica da infecção. Observamos aumento na frequência de células totais que expressam ligantes para a lectina PNA e diminuição no percentual de células que expressam ligantes para lectina SNA. Observamos aumento na frequência de células PNA^{int/high} e diminuição do percentual de células SNA^{high} e MAL^{high} em células T CD8⁺ e CD4⁺. O estudo dos perfis de ativação, migração e funcionalidade das células T CD8 totais, reproduz achados da literatura. As células esplênicas CD8⁺PNA⁺ apresentaram perfis de ativação, migração e funcionalidade semelhantes às células T CD8 totais. A população CD8⁺PNA⁺, assim como as células T CD8⁺ totais, é enriquecida em células que expressam IFN γ . Assim, o presente estudo traz resultados preliminares que sugerem não haver alteração no perfil de glicosilação em proteínas séricas, trazendo a perspectiva de busca de modelos de infecção mais apropriados (com infecção e quadros clínicos mais graves). A ausência de células mononucleares PNA⁺ na inflamação em tecido cardíaco e o enriquecimento em células CD8⁺PNA⁺ ativadas, com potencial de migração e com perfil IFN γ ⁺Pfn^{neg} no baço nos abrem a perspectiva de estudar se as células PNA⁺ não migram, acumulando-se na periferia, ou se migram e ao entrarem no tecido cardíaco são induzidas à morte ou têm seu glicofenótipo alterado.

Desde a descrição da tripanossomíase americana por Carlos Chagas (Chagas, 1909), muito ainda resta a saber sobre os mecanismos que levam determinados indivíduos a desenvolverem as formas indeterminada, cardíaca, digestiva ou mista desta enfermidade (Rassi, Rassi & Marin-Neto, 2010; Rassi, Rassi & Marcondes De Rezende, 2012). Quando pensamos apenas na forma cardíaca, a mais grave manifestação da DC, mais questionamentos são levantados acerca dos fatores que determinam a gravidade levando à progressão da doença, que pode culminar em insuficiência cardíaca e morte.

Para melhor entender e explorar os mecanismos que levam às diferentes manifestações da DC, nosso grupo de pesquisa tem contribuído com modelos experimentais que mimetizam aspectos desta patologia (Dos Santos *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2009; Silverio *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2015). Conforme estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Silverio *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2015), o presente trabalho avaliou os aspectos da DC utilizando a cepa Colombiana do *T. cruzi* em camundongos da linhagem C57BL/6. Reproduzimos achados característicos deste modelo como parasitemia, que alcançou pico em 42 dpi (fase aguda) e controle após 90 dpi (fase crônica), quando raros parasitos são encontrados no sangue circulante (Silverio *et al.*, 2012). A sobrevivência dos animais foi superior a 70% (Silverio *et al.*, 2012; Vilar-Pereira, Ruivo & Lannes-Vieira, 2015). Aspectos clínicos também foram avaliados, como variação no peso e temperatura dos animais. Grave perda de peso corporal (cerca de 20-30%) foi observada em camundongos da linhagem C3H/He na fase aguda (12 -30 dpi) da infecção com a cepa Tipo VI RA (Cazorla *et al.*, 2015) e na infecção aguda (21- 30 dpi) de camundongos BALB/c pela cepa Tipo II Y (Silva *et al.*, 2012). Não detectamos variação de peso corporal dos animais C57BL/6 durante o período de acompanhamento da infecção pela cepa Tipo I Colombiana. Estes diferentes achados quanto à perda de peso corporal observados nos estudos, podem ser ocasionados pelo uso de diferentes linhagens de camundongos e cepas do *T. cruzi*, refletindo as diferentes relações entre parasito e hospedeiro. A marcante perda de peso corporal, refletindo caquexia, foi associada a altas concentrações de TNF circulante, sendo atenuada com uso de anti-TNF (Truyens *et al.*, 1995). Camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* apresentaram manifestação moderada da forma cardíaca e menores concentrações de TNF circulante quando comparados a animais C3H/He infectados com a mesma cepa (Pereira *et al.*, 2014 a), reforçando que características do hospedeiro são determinantes para as manifestações clínicas da DC experimental.

Diminuição de temperatura foi observada na infecção de camundongos BALB/c infectados com a cepa Y na fase aguda e associada a perda de peso, caquexia e alterações comportamentais precedendo a morte (Silva *et al.*, 2012). No presente estudo, redução na temperatura retal foi observada em diferentes momentos no estudo cinético de infecção, de forma dissociada da perda de peso corporal, não caracterizando a presença de comportamento associado à doença (*sickness behavior*) e, assim, corroborando dados

anteriores (Vilar-Pereira, Ruivo & Lannes-Vieira, 2015). Estas características podem contribuir para que, de modo relevante, em nosso estudo a maioria dos animais infectados (~ 70%) sobreviva à infecção aguda e desenvolva a forma crônica da DC.

Alterações elétricas não foram observadas em 14 dias pós-infecção, momento em que foram observados os primeiros parasitos circulantes. No pico de parasitemia (42 dpi), as alterações elétricas tais como bradicardia, arritmias e bloqueios átrio-ventriculares estavam presentes. Na fase crônica (120 dpi), quando a parasitemia já estava controlada, todos os animais apresentavam alterações elétricas. Estudo anterior utilizando o mesmo modelo mostrou uma relação direta entre a parasitemia e o parasitismo cardíaco (Silverio *et al.*, 2012), sugerindo que as alterações elétricas não estão diretamente relacionadas à carga parasitária no tecido cardíaco. Como revisto anteriormente, a carga parasitária aumentada na fase aguda é controlada à medida que a resposta imune se estabelece e não está, proporcionalmente, relacionada à evolução clínica da DC (Junqueira *et al.*, 2010). De fato, publicação recente mostrou que a carga parasitária, revelada por detecção de DNA do *T. cruzi* em soro, foi semelhante nas formas clínicas indeterminada, digestiva e cardíaca da DC (Melo *et al.*, 2015). Também, o estudo BENEFIT, no qual portadores crônicos da forma cardíaca da DC foram tratados com Benznidazol, mostrou que a redução na carga parasitária não impactou de forma significativa na deterioração clínica dos pacientes (Morillo *et al.*, 2015). Em conjunto, os dados apresentados suportam que o modelo que adotamos reproduz aspectos importantes da DC, como a cinética de parasitemia, apresentando manifestações clínicas moderadas da forma cardíaca e alta taxa de sobrevivência, permitindo o uso deste modelo para explorar as perguntas específicas do presente trabalho.

A interação entre moléculas de superfície presentes nos organismos patogênicos e hospedeiros é a principal forma que microrganismos possuem para se estabelecer e perpetuar a infecção (Cascioferro, Cusimano & Schillaci, 2014). Proteínas e lipídeos são as principais moléculas encontradas na superfície das células e servem como “pontes” de interação entre meio extra e intracelular. Frequentemente, essas moléculas possuem ligadas à sua cadeia, oligossacarídeos que ficam expostas no meio, formando o glicocálix. É através da ligação de moléculas presentes na superfície de microrganismos e moléculas do glicocálix das células do hospedeiro que a interação acontece. Proteínas presentes no soro dos organismos vivos, tais como as imunoglobulinas, também podem possuir oligossacarídeos ligados à sua estrutura (Komatsu *et al.*, 2016). Diversas doenças como

cânceres, diabetes e doenças inflamatórias apresentam modificações no padrão de glicosilação de proteínas encontradas no soro dos pacientes (Bunn, Gabbay & Gallop, 1978; Gornik & Lauc, 2008; Mechref *et al.*, 2012). O estudo das formas de glicosilação aberrantes encontradas no soro, tem sido promissor para ser utilizado como biomarcador de diagnóstico e prognóstico em câncer (Saldoval *et al.*, 2008), doenças inflamatórias como artrite reumatoide (Collins *et al.*, 2013) e, até mesmo, em doenças congênitas (Van Scherpenzeel, Willems & Lefeber, 2016).

Algumas metodologias, como a espectrometria de massas por MALDI-TOF, têm sido utilizadas como ferramentas para caracterização da estrutura de oligossacarídeos presentes em proteínas (Harvey, 1996). Esta metodologia permite que a estrutura de diversos componentes seja analisada através de uma relação massa/carga (m/z). Após um longo e complexo processo de preparo das amostras, extraindo as N-glicanas presentes em proteínas séricas, as moléculas são dissociadas através de feixes de laser (MALDI), a partir daí os íons de diversas massas são acelerados juntos através de uma coluna e se separam pelas diferenças de massa e carga, atingindo o segundo ponto em diferentes tempos (TOF) (Kaufmann, 1995).

A presença de um organismo patogênico como o *T. cruzi*, as alterações fisiológicas provindas da sua persistência e a ação da TS, uma enzima capaz de realocar o Neu5Ac em terminais sacarídicos do parasito e do hospedeiro (Frasch, 2000; De-Rubin & Schenkman, 2012; Freire-De-Lima *et al.*, 2012), poderiam causar alterações marcantes nas proteínas séricas do hospedeiro. Esse conjunto de dados da literatura no levou a fazer o estudo das N-glicanas presentes no soro dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*, apresentando a forma cardíaca da DC experimental. Para tal, coletamos soro de camundongos infectados com a cepa Colombiana, em diferentes momentos da infecção 14 dpi (precede pico de parasitemia e sinais clínicos), 42 dpi (pico de parasitemia e sinais clínicos já estabelecidos) e 120 dpi (após controle da parasitemia e com evolução de sinais clínicos). Contudo, a análise do soro usando espectrometria de massas por MALDI-TOF, não revelou alterações quantitativas nem qualitativas nas glicanas. Embora não significativo, observamos apenas um ligeiro aumento em glicanas na faixa do espectro (1500-2500), no qual normalmente são encontrados oligossacarídeos presentes em imunoglobulinas (Zauner *et al.*, 2013).

Camundongos da linhagem C57BL/6 infectados com a cepa Colombiana, apresentam aumento da concentração de imunoglobulinas específicas para antígeno do parasito no pico

de parasitemia (42 dpi), que persiste na fase crônica (Silva *et al.*, 2010). A ausência de alterações nas glicanas de proteínas séricas de camundongos da linhagem C57BL/6 infectados, ainda que frustrante, talvez seja explicada pelo fato destes animais não apresentarem níveis elevados de imunoglobulinas totais (Silva *et al.*, 2010), o que caracteriza ausência de ativação policlonal nestes animais (Minoprio *et al.*, 1986). Outro fator que poderia explicar a ausência de alterações nas glicanas de proteínas séricas seria o fato destes animais apresentarem forma moderada da cardiomiopatia chagásica crônica (Pereira *et al.*, 2014 a).

Resta-nos buscar novos modelos que permitam testar a ideia que as alterações de glicosilação das proteínas séricas possam ser utilizadas como biomarcadores de infecção ou de quadro clínico. Neste contexto, uma possibilidade seria o uso de camundongos da linhagem C3H/He infectados com a cepa Colombiana, que apresentam maiores concentrações de imunoglobulinas totais no soro, além de apresentarem a forma grave da cardiomiopatia chagásica crônica (Silva *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2014 a). Contudo, a ausência de alterações nas glicanas de proteínas séricas no modelo que estudamos pode refletir uma característica biológica da infecção pela cepa Colombiana do *T. cruzi*. Para testar esta ideia, temos como proposta o estudo utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 e C3H/He infectados com baixo e alto inóculos da cepa Y do *T. cruzi*.

Entre os monossacarídeos que formam a estrutura das glicanas, o açúcar frequentemente encontrado na posição terminal de oligossacarídeos presentes no glicocálix das células é o Neu5Ac. Assim, não é de se estranhar que este mesmo açúcar esteja envolvido em processos de interação célula-célula e célula-patógeno (Varki & Schauer, 2009). Mesmo estruturas básicas como vírus se utilizam de modificações no perfil de glicosilação para interagir com formas de vida mais complexas. O vírus influenza, por exemplo, foi o primeiro microrganismo descrito a utilizar-se de uma sialidase, enzima capaz de remover Neu5Ac de oligossacarídeos, para invadir a células dos organismos hospedeiros (Schauer, 2000; Nicholls *et al.*, 2008). Outras enfermidades, como cânceres também têm sido exaustivamente estudadas acerca da presença ou ausência de Neu5Ac como marcador de malignidade e resistência a drogas (Crocì *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, lectinas se tornaram uma importante ferramenta que permite a identificação de terminais glicosídicos. A lectina PNA (*Peanut agglutinin, Arachis hypogaea*) se liga a terminal pré-siálico (Galβ1-3GalNAcα1-Ser/Thr), enquanto que a

lectina SNA (*Elderberry lectin, Sambucus nigra*), se liga ao terminal siálico Neu5Ac α 2-6Gal(NAc)-R e a lectina MAL (*Maackia amurensis leukoagglutinin, Maackia amurensis*) reconhece terminal siálico Neu5AcGc α 2-3Gal β 1,4Glc(NAc). O uso destas lectinas permite identificar especificamente diferentes formas de ligação do Neu5Ac a seus terminais. Ausência ou presença de Neu5Ac em terminais glicosídicos, podem evidenciar maturação celular de linfócitos no timo (Amado *et al.*, 2004), angiogênese e resistência a drogas em tumores (Crocì *et al.*, 2014) e subversão do sistema imune por agentes patogênicos como o *T. cruzi* (Freire-De-Lima *et al.*, 2010). A capacidade de lectinas se ligarem a áreas específicas de tecidos tem sido utilizada para investigar a presença ou ausência de Neu5Ac, principalmente como marcador de malignidade e metástases em tumores (Horii *et al.*, 2012; Dos-Santos *et al.*, 2014). Assim, nosso próximo passo foi identificar se durante a infecção pelo *T. cruzi* havia alterações glicosídicas que levariam a modificações no perfil de ligação das lectinas em tecido cardíaco e em células mononucleares do sistema imune, que são os principais componentes dos infiltrados inflamatórios encontrados neste tecido (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; dos Santos *et al.*, 2001).

Uma das características que denotam a presença de lesão em tecido cardíaco é a presença de fibrose (Andrade *et al.*, 1991; Higuchi Mde *et al.*, 2003). Então, antes de analisarmos as marcações para lectinas nesse tecido, estudamos a diferença na deposição de fibronectina entre animais não infectados e infectados. O aumento no depósito de fibronectina em tecido cardíaco indica a presença de fibrose na infecção crônica pelo *T. cruzi* em camundongos (Andrade, Grimaud & Stocker-Guerret, 1989) e pacientes (Higuchi *et al.*, 1999). Observamos em cortes de tecido cardíaco de animais infectados uma maior intensidade na marcação para fibronectina, nas fases aguda e crônica da infecção, quando comparados aos animais não infectados pareados por idade e sexo, corroborando achados anteriores (Andrade & Grimaud, 1986; Dos Santos *et al.*, 2001). Mais recentemente, a intensidade da deposição de fibronectina em tecido cardíaco foi diretamente relacionada à gravidade da CCC experimental (Pereira *et al.*, 2014 a). Assim, mostramos que além de alterações elétricas, estes camundongos apresentam alterações histopatológicas que caracterizam presença de fibrose e são compatíveis com lesões cardíacas encontradas em pacientes da DC (Higuchi *et al.*, 1999).

Para validar o ensaio e a marcação para lectinas em tecido cardíaco, cortes de baço foram feitos simultaneamente aos de coração dos respectivos animais e analisados para

presença ligantes para as lectinas PNA, SNA e MAL. Fraca marcação para a lectina PNA e DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*), esta última que se liga a terminais α -N-acetilgactosamina, foi observada em diferentes tecidos como pulmão, baço, rim, fígado, cérebro e tecido muscular, porém a marcação para a lectina PNA se restringiu à fáscia muscular (Watanabe *et al.*, 1981). Cortes de tecido esplênico de camundongos BALB/c mostraram tênue marcação para a lectina PNA em estruturas fibrilares, linfócitos e polpa branca (Watanabe *et al.*, 1981). A pouca marcação para lectina PNA em baço e outros tecidos, pode ser um indicador da forte presença de Neu5Ac em terminais glicosídicos nestes tecidos. Em nosso estudo, ainda que não tenhamos caracterizado as áreas do baço para cada lectina estudada, em todos os cortes de baço, incluindo tecidos de animais infectados e não infectados, observamos células marcadas para as lectinas PNA, SNA e MAL validando o uso de lectinas para o estudo de tecido cardíaco.

A análise dos cortes de tecido cardíaco submetidos à marcação para as lectinas estudadas, demonstrou diferença entre animais não infectados e infectados, nos diferentes pontos analisados. No tecido cardíaco dos animais infectados, detectamos marcação para ligantes da lectina MAL de forma semelhante a encontrada em animais não infectados, revelando a presença de sialilações do tipo α -2,3-x em componentes do tecido cardíaco e nas células inflamatórias. Por outro lado, observamos aumento na marcação para SNA, indicando enriquecimento nas sialilações do tipo α -2,6-x em fibras cardíacas e em células inflamatórias infiltrando o tecido cardíaco. Esta forte presença de padrão de marcação compatível com a presença de sialilações do tipo α -2,3-x e α -2,6-x em células cardíacas, células inflamatórias mononucleares invadindo o tecido e, possivelmente, componentes da matriz extracelular estaria relacionada à baixa expressão de terminais pré-siálicos α -2,3-x, o que explicaria a redução de marcação para a lectina PNA no tecido de animais infectados.

A lectina SNA reconhece o ácido siálico ligado de forma Neu5Ac α -2,6, diminuição na presença de silalilação do tipo α -2,6, reconhecida por esta lectina, em células cardíacas e mononucleares invadindo o tecido cardíaco, pode indicar, indiretamente, uma maior ação de seu ligante endógeno galectin-1, o que poderia contribuir para a morte de células de perfil inflamatório Th1 e Th17 (Toscano *et al.*, 2007). Em estudo anterior em nosso laboratório, mostramos que a medida que a infecção pelo *T. cruzi* se cronifica, há redução do número de células IFN γ ⁺ no tecido cardíaco e progressão da CCC (Silverio *et al.*, 2012). Este achado nos leva a ter como perspectiva o estudo do perfil funcional relacionado a expressão de

citocinas e moléculas efetoras em células SNA na infecção pelo *T. cruzi*.

A lectina PNA se liga de forma específica em terminais pré-siálicos Gal β 1-3, ou seja, terminais passíveis de receber a molécula de Neu5Ac na posição terminal (Freire-De-Lima *et al.*, 2010). Esta lectina é uma ferramenta essencial para o estudo de como microrganismos podem se utilizar de Neu5Ac para subverter o sistema imune. A utilização de anticorpo S7 mAb que reconhece especificamente a molécula de CD43 que expressa terminal Neu5Ac, demonstrou ser CD43 uma das principais moléculas aceptoras deste monossacarídeo em células T (Jones *et al.*, 1994). Durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, usando este anticorpo (S7 mAb), revelamos não apenas aumento da frequência de células T CD8⁺ e CD4⁺ co-expressando a molécula CD43^{Neu5Ac} e ligantes da lectina PNA como também aumento na densidade dessas moléculas na superfície de células T. Linfócitos T maturados no timo ganham a circulação sanguínea com perfil PNA^{low}. Estas mesmas células quando apresentadas a antígenos passam a expressar perfil PNA^{high}, indicando o estado de ativação dessas células (Amado *et al.*, 2004). Aumento na frequência de células expressando o perfil CD43^{Neu5Ac}, em animais não infectados (controles em 120 dpi), pode indicar maior resistência a agentes infecciosos com o envelhecimento animal. Embora animais infectados pelo *T. cruzi*, por volta das quatro semanas de vida, tenham apresentado perfil PNA^{high} em 120 dpi, este não conferiu maior resistência no curso da infecção. Há a necessidade de estudos complementares e infecção de animais envelhecidos, onde já observamos possuírem maior frequência de células com maior densidade da molécula de CD43^{Neu5Ac} para confirmar esta ideia. Infecção causada pelo protozoário parasito *Plasmodium berghei* resultou em maior frequência de células T CD8⁺ expressando ligantes para a lectina PNA, quando comparada à infecção pelo *T. cruzi* (Freire-De-Lima *et al.*, 2010). A maior frequência de células CD43^{Neu5Ac}PNA⁺ bem como a maior densidade de CD43^{Neu5Ac} indica que outra molécula pode estar perdendo o terminal siálico além de CD43, já que o anticorpo utilizado S7 mAb é específico para epítomos sialilados desta molécula (Jones *et al.*, 1994). Por outro lado, o aumento na densidade de CD43^{Neu5Ac} na superfície das células T, mesmo entre animais não infectados pode sugerir que a senescência talvez deixe o sistema imune mais rápido em responder a infecções. Assim, maior frequência de células T expressando a molécula de CD43^{Neu5Ac} indica menor estado de ativação destas células. Também observamos menor frequência de células expressando ligantes para a lectina SNA no baço dos animais infectados. Galectina-1 se liga a diferentes terminais do tipo galactose- β 1-4-N-

acetilglucosamina (Stowell *et al.*, 2004). A perda da expressão de ligantes para a lectina SNA deixa as células mais susceptíveis à ação de galectina-1 que promove apoptose celular (Toscano *et al.*, 2007). A ação de sialiltransferases do hospedeiro, durante a infecção pelo *T. cruzi*, diminuindo a frequência de células T CD8⁺ expressando ligantes para a lectina SNA, talvez deixe essas células mais expostas à ação de galectina-1. Em conjunto, nossos dados indicam que as células presentes no baço de animais infectados estariam, teoricamente, mais expostas à atividade de galectinas que induzem apoptose celular (Toscano *et al.*, 2007; Earl, Bi & Baum, 2010). Por outro lado, a maior frequência de células T CD8⁺ expressando moléculas de CD43^{Neu5Ac}, nos faz questionar o aumento na frequência de células expressando ligantes para PNA. Apesar de a molécula de CD43 ser um expressivo acceptor para Neu5Ac, a superfície das células T está densamente preenchida pela glicoproteína CD45. De fato, estima-se que cerca de 10% das moléculas presentes na superfície dos linfócitos sejam formados por CD45 (Earl, Bi & Baum, 2010). Esta molécula é, também, uma das principais glicoproteínas presentes na superfície de células T contendo terminais siálicos e pode sofrer ação de enzimas que atuem sobre ligações tanto do tipo α -2,3-x como α -2,6-x (Earl, Bi & Baum, 2010). Contudo, na infecção crônica de camundongos pelo *T. cruzi*, foi anteriormente descrito aumento na frequência de células T CD8^{low} com significativa redução na densidade de CD45 (RA, RB e RC) (Grisotto *et al.*, 2001). Assim, o conjunto de nossos dados pode indicar que apesar de aparentemente mais ativadas, as células T CD8⁺ se encontram menos responsivas na infecção pelo *T. cruzi*.

Dados da literatura mostram que células T CD8⁺ não ativadas apresentam fenótipo CD44^{-low}CD62L⁺, indicando que estas células ainda não entraram em contato com antígenos. Por outro lado, o fenótipo CD44^{+high}CD62L^{-low} indica células em estado ativado e primadas a antígenos (Sallusto *et al.*, 1999). De fato, observamos nos animais infectados, diminuição da frequência de células *naïve* (CD44^{-low}CD62L^{+high}) e aumento da frequência de células com perfil ativado (CD44^{+high}CD62L^{-low}), em momento muito precoce da infecção, precedendo o pico de parasitemia (14 dpi), e persistindo na fase crônica (120 dpi). Nossos dados são sustentados por dados da literatura que mostram que animais em fase crônica de infecção apresentam maior frequência de células T CD8⁺ com perfil efetor CD44^{high}CD62L^{low} e menor frequência de células com perfil *naïve* CD44^{low}CD62L^{high} (Dos Santos *et al.*, 2001; Grisotto *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2015). Também as células CD8⁺PNA⁺ apresentaram menor frequência de células com perfil *naïve* e maior proporção

de células com fenótipo ativado $CD44^{+/\text{high}}CD62L^{-/\text{low}}$, em todos os pontos analisados. Independente do estado de infecção, detectamos na população de células $CD8^+PNA^+$ aumento na frequência de células ativadas, corroborando dados da literatura (Amado *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 1994).

De forma muito semelhante às células CD8 totais observamos, precedendo ao pico de parasitemia (14 dpi), aumento na frequência de células $CD8^+PNA^+$ expressando as moléculas de adesão e migração celular (LFA-1, CCR5 e CCR1). Durante a infecção pelo *T. cruzi* observa-se aumento na expressão de ICAM-1, ligante para LFA-1, em endotélio e células cardíacas, e de moléculas quimioatraentes (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP1 α , CCL4/MIP1 β e CCL5/RANTES) para células que expressam CCR1 e/ou CCR5, no tecido cardíaco (dos Santos *et al.* 2001; Marino *et al.*, 2004; Michailowsky *et al.* 2004; Medeiros *et al.*, 2009). Estudos anteriores, mostraram a participação destas moléculas na migração de células T $CD8^+$ e $CD4^+$ para o tecido cardíaco e de sua ação no controle da infecção (Michailowsky *et al.* 2004) e na injúria no tecido cardíaco (Marino *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2009). O aumento na frequência de células esplênicas $CD8^+PNA^+$ expressando moléculas que potencialmente permitam sua migração para o tecido cardíaco é paradoxal à ausência de células PNA^+ neste tecido. A não detecção de células PNA^+ em tecido cardíaco pode indicar que esteja ocorrendo acúmulo destas células também em outros compartimentos, como o sangue, o que precisa ser explorado.

Durante a infecção experimental de camundongos da linhagem C57BL/6 pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, células T $CD8^+$ encontram-se fenotipicamente segregadas em $IFN\gamma$ e Pfn^+ . Células específicas ao epítipo VNHRFTLV da molécula ASP2 do parasito, restrito ao contexto H-2K^b, que expressam $IFN\gamma$ encontram-se majoritariamente em baço e tecido sanguíneo, enquanto células Pfn^+ específicas a este epítipo encontram-se preferencialmente em tecido cardíaco, mostrando-se diferencialmente compartimentalizadas (Silverio *et al.*, 2012). De modo interessante, este trabalho também mostrou que as células T $CD8^+IFN\gamma^+$ e T $CD8^+Pfn^+$ são funcionalmente antagônicas, tendo as $IFN\gamma^+$ um papel protetor e as Pfn^+ um papel deletério quanto à injúria cardíaca e alterações elétricas (Silverio *et al.*, 2012). Observamos no presente trabalho, um enriquecimento de células $IFN\gamma^+$ entre as células T $CD8^+$ totais e as PNA^+ em baço dos animais em fase crônica da infecção (120 dpi). Embora não tenhamos estudado a especificidade das células, o aumento na frequência de células T $CD8^+PNA^+$ que expressam $IFN\gamma$ em baço, poderia ser explicado pelo acúmulo de células T

CD8⁺IFN γ ⁺ e células T CD8⁺IFN γ ⁺ específicas para VNHRFTLV em tecidos periféricos, respectivamente, sangue e baço (Silverio *et al.*, 2012). Deste modo, o acúmulo das células T CD8⁺PNA⁺IFN γ ⁺ em baço, poderia explicar, pelo menos em parte, a não detecção de células PNA⁺ em tecido cardíaco de animais cronicamente infectados e com sinais de CCC (alterações elétricas e aumento da deposição de fibronectina). Aparentemente, estamos diante de algum mecanismo capaz de impedir a chegada de células PNA⁺ ao tecido alvo das principais alterações clínicas de fase crônica neste modelo experimental da DC, o que se constitui um desafio a ser compreendido. Este dado torna-se mais relevante considerando a possível não entrada de células T CD8⁺PNA⁺ ativadas, potencialmente capazes de migrar e benéficas à injúria cardíaca. Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade das células T CD8⁺PNA⁺ migrarem, chegaram ao tecido e neste receberem o terminal siálico de forma α -2,3-x, perdendo assim a capacidade de ligar com a lectina PNA, o que explicaria os achados no estudo por imunistoquímica em cortes de tecido cardíaco. Por outro lado, não se pode excluir que as células T CD8⁺PNA⁺ migrarem, chegaram ao tecido sofram morte celular. De fato, durante processo de insuficiência cardíaca há aumento na expressão de galectina-3, que se liga ao mesmo terminal reconhecido pela lectina PNA (Ferrer *et al.*, 2014; Pineda *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Na DC experimental, a presença de galectina-3 está associada a gravidade da fibrose e inflamação (Pineda *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). Assim, podemos pensar que células T CD8⁺PNA⁺IFN γ ⁺, sejam ativadas, migrem para o tecido cardíaco e lá sofram morte celular, o que explicaria a ausência de células PNA⁺ na marcação por imunistoquímica. Assim, se este for um processo real, explicaria a ausência de células T CD8⁺IFN γ ⁺ específicas ao epítipo VNHRFTLV da molécula ASP2 em tecido cardíaco dos animais infectados pelo *T. cruzi* (Silverio *et al.*, 2012), o que precisa ser explorado.

Por outro lado, achados em fase crônica como a diminuição da frequência de células T SNA⁺, em tecido esplênico, precisam ser melhor analisados e estudados quanto a funcionalidade dessas células. Em nossos experimentos, mostramos baixa frequência de células Pfn⁺ entre as células T CD8⁺ totais e PNA⁺ em baço dos animais cronicamente infectados. Podemos especular que as células Pfn⁺ possuam um glicofenótipo diferenciado, com expressão de ligantes de SNA e que estes achados estejam relacionados à baixa frequência de células SNA⁺ em tecido periférico e presença de células mononucleares SNA⁺ que infiltram o tecido cardíaco. Se estas expressarem Pfn, também explicaria o

enriquecimento relativo em células Pfn⁺ e, particularmente, T CD8⁺Pfn⁺ específicas ao epítipo VNHRFTLV da molécula ASP2 em tecido cardíaco dos animais infectados pelo *T. cruzi* na fase crônica da infecção (Silverio *et al.*, 2012), o que também precisa ser investigado.

Nosso estudo, não permitiu a identificação de biomarcadores de natureza glicosídica que reflitam a infecção e/ou gravidade da forma cardíaca da DC experimental. Contudo, abre novas perspectivas para estudos em outros modelos de infecção, buscando marcadores de glicosilação em proteínas séricas, e sobre a compartimentalização de células fenotipicamente distintas e funcionalmente relacionadas à proteção de lesão e/ou à injúria cardíaca na infecção pelo *T. cruzi*.

8. CONCLUSÕES

O conjunto desses dados nos permitem concluir que:

- ✓ No modelo em estudo e nos tempos analisados (14, 42 e 120 dpi), não identificamos alterações no perfil de N-glicanas em proteínas séricas;
- ✓ O aumento da expressão para ligantes da lectina SNA em tecido cardíaco e em células mononucleares que infiltram o tecido sugere aumento na sialilação do tipo α -2,6-x em componentes do tecido cardíaco e em células inflamatórias, em todos os pontos analisados;
- ✓ A presença de alterações glicosídicas em células viáveis totais e nas subpopulações de células T de baço de animais infectados, com aumento da frequência de células PNA⁺ e diminuição da frequência de células SNA⁺, assim como a ausência de células inflamatórias PNA⁺ e acúmulo de células SNA⁺ em tecido cardíaco sugere uma compartimentalização diferenciada que poderia ser relacionada ao glicofenótipo dessas células;
- ✓ A diminuição de marcação para ligantes da lectina PNA em componentes do tecido cardíaco e em células inflamatórias que nele se infiltram, pode indicar a não chegada de células inflamatórias PNA⁺ no tecido cardíaco, a diminuição na expressão de terminais Gal β 1-3 ou a morte células PNA⁺ na infecção experimental pelo *T. cruzi*;
- ✓ A presença de células T CD8⁺CD43^{Neu5Ac}PNA⁺ no baço de animais infectados pelo *T. cruzi* indica que outra molécula, além de CD43, é alvo de alteração glicosídica expondo terminais α -2,3-x que permitem a ligação da lectina PNA;
- ✓ O acúmulo de células T CD8⁺PNA⁺ ativadas, potencialmente capazes de migrar (CD44^{+/high}CD62L^{-/low}, LFA-1⁺CCR5⁺ e LFA-1⁺CCR1⁺) e com perfil inflamatório (IFN γ ⁺) em baço de animais infectados, poderia explicar a ausência dessas células em tecido cardíaco;
- ✓ A retenção de células T CD8⁺PNA⁺IFN γ ⁺Pfn^{neg}, potencialmente protetoras, no baço de animais cronicamente infectados poderia explicar o agravamento da injúria cardíaca e das alterações elétricas encontradas na fase crônica da infecção.

9. PERSPECTIVAS

Os achados aqui apresentados e discutidos à luz da literatura nos trazem às seguintes perspectivas:

- ✓ Desafiar nossa ideia da existência de biomarcadores glicosídicos em proteínas séricas em modelos da doença de Chagas experimental que cursem com forma cardíaca mais grave da infecção, como infecção aguda por alto inóculo de parasitos da cepa Y e infecção crônica de camundongos C3H/He pela cepa Colombiana;
- ✓ Identificar os mecanismos que levam ao acúmulo/retenção de células T CD8⁺PNA⁺IFN γ ⁺Pfn^{neg}, potencialmente protetoras, no baço dos animais infectados;
- ✓ Esclarecer os mecanismos celulares e moleculares que levem à ausência da expressão de ligantes para a lectina PNA em componentes do tecido cardíaco e em células inflamatórias que infiltram este tecido na infecção experimental pelo *T. cruzi*.
- ✓ Identificar a funcionalidade, IFN γ ou Pfn, das células SNA⁺ em tecido periférico e cardíaco

10. REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Autoimmun**, v. 17, n. 1, p. 99-107, Aug 2001
- ACHYUTHAN, K. E.; ACHYUTHAN, A. M. Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human exo-alpha-sialidases (neuraminidases). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 129, n. 1, p. 29-64, May 2001
- ALBAREDA, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8+ T cells in chronic Chagas' disease patients. **Int Immunol**, v. 18, n. 3, p. 465-71, Mar 2006
- AMADO, M. et al. Peanut agglutinin high phenotype of activated CD8+ T cells results from de novo synthesis of CD45 glycans. **J Biol Chem**, v. 279, n. 35, p. 36689-97, Aug 27 2004
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). **Rev Pat Trop**, v. 1, p. 65-121, 1974
- ANDRADE, S. G.; GRIMAUD, J. A. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi*--an ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 1, p. 29-41, Jan-Mar 1986
- ANDRADE, S. G.; GRIMAUD, J. A.; 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**, v. 40, n. 3, p. 252-60, Mar 1989
- ANDRADE, S. G. et al. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 187-200, Apr-Jun 1991
- AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 54, n. 2, p. 396-9, Aug 1965

BENATAR, A. F. et al. Galectin-1 Prevents Infection and Damage Induced by Trypanosoma cruzi on Cardiac Cells. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 10, p. e0004148, Oct 2015

BI, S.; BAUM, L. G. Sialic acids in T cell development and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 12, p. 1599-610, Dec 2009

BI, S. et al. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. **J Biol Chem**, v. 283, n. 18, p. 12248-58, May 2 2008

BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 56, n. 4, p. 425-35, Mar 3 2004

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 2, p. 67-74, Mar-Apr 2008

BLIX, G. The carbohydrate groups of the submaxillary mucin. **ChemPort**, v. 240, p. 43-54, 1936

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). **Blood**, v. 9, n. 12, p. 1194-8, Dec 1954

BUNN, H. F.; GABBAY, K. H.; GALLOP, P. M. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. **Science**, v. 200, n. 4337, p. 21-7, Apr 7 1978

BUSCAGLIA, C. A. et al. The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. **J Infect Dis**, v. 177, n. 2, p. 431-6, Feb 1998

CAMANDAROBA, E. et al. Trypanosoma cruzi: clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism. **Int J Exp Pathol**, v. 87, n. 3, p. 209-17, Jun 2006

CARVALHO, C. M. et al. Inducible nitric oxide synthase in heart tissue and nitric oxide in serum of Trypanosoma cruzi-infected rhesus monkeys: association with heart injury. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1644, 2012

CARVALHO, S. T. et al. A new class of mechanism-based inhibitors for Trypanosoma cruzi trans-sialidase and their influence on parasite virulence. **Glycobiology**, v. 20, n. 8, p. 1034-45, Aug 2010

CASCIOFERRO, S.; CUSIMANO, M. G.; SCHILLACI, D. Antiadhesion agents against Gram-positive pathogens. **Future Microbiol**, v. 9, n. 10, p. 1209-20, 2014

CAZORLA, S. I. et al. Oral multicomponent DNA vaccine delivered by attenuated Salmonella elicited immunoprotection against American trypanosomiasis. **J Infect Dis**, v. 211, n. 5, p. 698-707, Mar 1 2015

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 11-80, 1909

_____. Nova entidade mórbida do homem. **Brazil-Medico**, v. 24, n. 43-44-45, p. 423-428; 33-437, 443-447, 1910

COLLINS, E. S. et al. Glycosylation status of serum in inflammatory arthritis in response to anti-TNF treatment. **Rheumatology (Oxford)**, v. 52, n. 9, p. 1572-82, Sep 2013

CROCI, D. O. et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. **Cell**, v. 156, n. 4, p. 744-58, Feb 13 2014

DC-RUBIN, S. S.; SCHENKMAN, S. T. Trypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 10, p. 1522-30, Oct 2012

DIAS, W. B. et al. Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from Trypanosoma cruzi. **Cell Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 88-99, Jan 2008

DOS-SANTOS, P. B. et al. Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: a clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 5, p. 2337-49, 2014

DOS SANTOS, P. V. et al. 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**, v. 3, n. 12, p. 971-84, Oct 2001

DU, J. et al. Metabolic glycoengineering: sialic acid and beyond. **Glycobiology**, v. 19, n. 12, p. 1382-401, Dec 2009

EARL, L. A.; BI, S.; BAUM, L. G. N- and O-glycans modulate galectin-1 binding, CD45 signaling, and T cell death. **J Biol Chem**, v. 285, n. 4, p. 2232-44, Jan 22 2010

EBOS, J. M.; LEE, C. R.; KERBEL, R. S. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 16, p. 5020-5, Aug 15 2009

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and Progressive Myocarditis and Myositis in C3h Mice Infected with Trypanosoma Cruzi. **Am J Trop Med Hyg**, v. 13, p. 272-80, Mar 1964

FERRER, M. F. et al. DTU I isolates of Trypanosoma cruzi induce upregulation of Galectin-3 in murine myocarditis and fibrosis. **Parasitology**, v. 141, n. 6, p. 849-58, May 2014

FOKKINK, W. J. et al. Immunoglobulin G Fc N-glycosylation in Guillain-Barre syndrome treated with intravenous immunoglobulin. **Clin Exp Immunol**, v. 178 Suppl 1, p. 105-7, Dec 2014

FRASCH, A. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi. **Parasitol Today**, v. 16, n. 7, p. 282-6, Jul 2000

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. Trypanosoma cruzi subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8⁺ T cell responses. **J Biol Chem**, v. 285, n. 18, p. 13388-96, Apr 30 2010

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. The trans-sialidase, the major Trypanosoma cruzi virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, v. 25, n. 11, p. 1142-9, Nov 2015

FREIRE-DE-LIMA, L. et al. Sialic acid: a sweet swing between mammalian host and Trypanosoma cruzi. **Front Immunol**, v. 3, p. 356, 2012

GORNIK, O.; LAUC, G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. **Dis Markers**, v. 25, n. 4-5, p. 267-78, 2008

GRISOTTO, M. G. et al. Most parasite-specific CD8⁺ cells in Trypanosoma cruzi-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha and CD8 molecules. **Immunology**, v. 102, n. 2, p. 209-17, Feb 2001

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. [The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions]. **Acta Med Port**, v. 24 Suppl 4, p. 967-76, Dec 2011

HARVEY, D. J. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of oligosaccharides and glycoconjugates. **J Chromatogr A**, v. 720, n. 1-2, p. 429-46, Jan 12 1996

HIGUCHI, M. D. et al. Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 56, n. 5, p. 485-9, May 1997

HIGUCHI MDE, L. et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc Res**, v. 60, n. 1, p. 96-107, Oct 15 2003

HIGUCHI MDE, L. et al. Correlation between Trypanosoma cruzi parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc Pathol**, v. 2, n. 2, p. 101-6, Apr-Jun 1993

HIGUCHI, M. L. et al. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. **Heart**, v. 82, n. 3, p. 279-85, Sep 1999

HORII, Y. et al. Effects of L-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation. **Neurosci Lett**, v. 510, n. 1, p. 1-5, Feb 21 2012

HOTEZ, P. J. et al. Innovation for the 'bottom 100 million': eliminating neglected tropical diseases in the Americas. **Adv Exp Med Biol**, v. 764, p. 1-12, 2013

INBAR, M.; BEN-BASSAT, H.; SACHS, L. Membrane changes associated with malignancy. **Nat New Biol**, v. 236, n. 61, p. 3-4 passim, Mar 1 1972

JONES, A. T. et al. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. **J Immunol**, v. 153, n. 8, p. 3426-39, Oct 15 1994

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, Sep 15 2010

KANNAGI, R. Regulatory roles of carbohydrate ligands for selectins in the homing of lymphocytes. **Curr Opin Struct Biol**, v. 12, n. 5, p. 599-608, Oct 2002

KAUFMANN, R. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. **J Biotechnol**, v. 41, n. 2-3, p. 155-75, Jul 31 1995

KLESHCHENKO, Y. Y. et al. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. **Infect Immun**, v. 72, n. 11, p. 6717-21, Nov 2004

KOMATSU, E. et al. Characterization of immunoglobulins through analysis of N-glycopeptides by MALDI-TOF MS. **Methods**, Jan 7 2016

KROLL-PALHARES, K. et al. TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 375-85, Jun 2008

LANNES-VIEIRA, J.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment: ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. **J Histochem Cytochem**, v. 39, n. 11, p. 1539-46, Nov 1991

LANNES-VIEIRA, J. et al. Chronic *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy: from the discovery to the proposal of rational therapeutic interventions targeting cell adhesion molecules and chemokine receptors--how to make a dream come true. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl 1, p. 226-35, Jul 2009

LARANJA, F. S. et al. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. **Circulation**, v. 14, n. 6, p. 1035-60, Dec 1956

LU, J. et al. Structure of FcγRI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 3, p. 833-8, Jan 20 2015

MARINO, A. P. et al. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis. **Circulation**, v. 110, n. 11, p. 1443-9, Sep 14 2004

MASTRANGELO, A. et al. The Role of Posttranslational Protein Modifications in Rheumatological Diseases: Focus on Rheumatoid Arthritis. **J Immunol Res**, v. 2015, p. 712490, 2015

MECHREF, Y. et al. Identifying cancer biomarkers by mass spectrometry-based glycomics. **Electrophoresis**, v. 33, n. 12, p. 1755-67, Jul 2012

MEDEIROS, G. A. et al. Treatment of chronically Trypanosoma cruzi-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. **Microbes Infect**, v. 11, n. 2, p. 264-73, Feb 2009

MELO, M. F. et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 154, 2015

MENDONCA-PREVIATO, L. et al. Addition of alpha-O-GlcNAc to threonine residues define the post-translational modification of mucin-like molecules in Trypanosoma cruzi. **Glycoconj J**, v. 30, n. 7, p. 659-66, Oct 2013

MICHAILOWSKY, V. et al. Intercellular adhesion molecule 1 deficiency leads to impaired recruitment of T lymphocytes and enhanced host susceptibility to infection with Trypanosoma cruzi. **J Immunol**, v. 173, n. 1, p. 463-70, Jul 1 2004

MINOPRIO, P. M. et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. **Scand J Immunol**, v. 24, n. 6, p. 661-8, Dec 1986

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that Trypanosoma cruzi uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Lett**, v. 470, n. 3, p. 305-8, Mar 31 2000

MOREIRA, R. D. et al. Plant-Lectins, Chemical and Biological Aspects. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991

MORILLO, C. A. et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 373, n. 14, p. 1295-306, Oct 2015

MULLER, W. A. Localized signals that regulate transendothelial migration. **Curr Opin Immunol**, v. 38, p. 24-29, Nov 13 2015

NICHOLLS, J. M. et al. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. **Trends Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 149-57, Apr 2008

OLIVEIRA, I. A. et al. Trypanosoma cruzi Trans-sialidase: structural features and biological implications. **Subcell Biochem**, v. 74, p. 181-201, 2014

PAPPU, B. P.; SHRIKANT, P. A. Alteration of cell surface sialylation regulates antigen-induced naive CD8+ T cell responses. **J Immunol**, v. 173, n. 1, p. 275-84, Jul 1 2004

PEREIRA, I. R. et al. Pentoxifylline reverses chronic experimental Chagasic cardiomyopathy in association with repositioning of abnormal CD8+ T-cell response. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003659, Mar 2015

PEREIRA, I. R. et al. Severity of chronic experimental Chagas' heart disease parallels tumour necrosis factor and nitric oxide levels in the serum: models of mild and severe disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 289-98, Jun 2014 a

PEREIRA, I. R. et al. Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 798078, 2014 b

PEREIRA, M. E. et al. Lectin receptors as markers for Trypanosoma cruzi. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. **J Exp Med**, v. 152, n. 5, p. 1375-92, Nov 1 1980

PINEDA, M. A. et al. Lack of Galectin-3 Prevents Cardiac Fibrosis and Effective Immune Responses in a Murine Model of Trypanosoma cruzi Infection. **J Infect Dis**, v. 212, n. 7, p. 1160-71, Oct 1 2015

PREVIATO, J. O. et al. Incorporation of sialic acid into Trypanosoma cruzi macromolecules. A proposal for a new metabolic route. **Mol Biochem Parasitol**, v. 16, n. 1, p. 85-96, Jun 1985

PSHEZHETSKY, A. V.; HINEK, A. Where catabolism meets signalling: neuraminidase 1 as a modulator of cell receptors. **Glycoconj J**, v. 28, n. 7, p. 441-52, Oct 2011

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275-91, Jun 2012

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, Apr 17 2010

REIS, C. A. et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **J Clin Pathol**, v. 63, n. 4, p. 322-9, Apr 2010

REIS, D. D. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 48, n. 5, p. 637-44, May 1993

REIS MACHADO, J. et al. Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* reinfections. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 648715, 2014

SALDOVA, R. et al. Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. **Dis Markers**, v. 25, n. 4-5, p. 219-32, 2008

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6754, p. 708-12, Oct 14 1999

SCHAUER, R. Achievements and challenges of sialic acid research. **Glycoconj J**, v. 17, n. 7-9, p. 485-99, Jul-Sep 2000

SCHENKMAN, S. et al. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1117-25, Jun 28 1991

SEROPIAN, I. M. et al. Galectin-1 controls cardiac inflammation and ventricular remodeling during acute myocardial infarction. **Am J Pathol**, v. 182, n. 1, p. 29-40, Jan 2013

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, n. 4053, p. 949-59, Sep 15 1972

SILVA, A. A. et al. Trypanosoma cruzi-induced central nervous system alterations: from the entry of inflammatory cells to potential cognitive and psychiatric abnormalities. **J Neuroparasitol**, v. 1, 2010

SILVA, D. R. et al. Acute experimental Trypanosoma cruzi infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 211-6, Mar 2012

SILVERIO, J. C. et al. Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi infection. **Int J Exp Pathol**, v. 91, n. 1, p. 72-86, Feb 2010

SILVERIO, J. C. et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 4, p. e1002645, 2012

STOWELL, S. R. et al. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetylglucosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, v. 14, n. 2, p. 157-67, Feb 2004

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. **Microbes Infect**, v. 2, n. 8, p. 851-66, Jul 2000

TATSUTA, T. et al. Sialic acid-binding lectin (leczyme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. **Int J Oncol**, v. 43, n. 5, p. 1402-12, Nov 2013

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 6, p. 262-5, Jun 2002

TOSCANO, M. A. et al. Differential glycosylation of T(H)1, T(H)2 and T-H-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature Immunology**, v. 8, n. 8, p. 825-834, Aug 2007

TRUYENS, C. et al. The cachexia associated with Trypanosoma cruzi acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. **Parasite Immunol**, v. 17, n. 11, p. 561-8, Nov 1995

VAN SCHERPENZEEL, M.; WILLEMS, E.; LEFEBER, D. J. Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. **Glycoconj J**, Jan 7 2016

VARKI, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1023-9, Apr 26 2007

_____. Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 6, Jun 2011

VARKI, A. et al. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN 9780879697709.

VARKI, A.; GAGNEUX, P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1253, p. 16-36, Apr 2012

VARKI, A.; LOWE, J. B. Biological Roles of Glycans. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN 9780879697709.

VARKI, A.; SCHAUER, R. Sialic Acids. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN 9780879697709.

VARKI, A.; SHARON, N. Historical Background and Overview. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN 9780879697709.

VIANNA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Molestia de Carlos Chagas" (Esquizotripanose humana ou tireoidite parasitária). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 276-293, 1911

VILAR-PEREIRA, G.; RUIVO, L. A.; LANNES-VIEIRA, J. Behavioural alterations are independent of sickness behaviour in chronic experimental Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1042-50, Dec 2015

VIMR, E.; LICHTENSTEIGER, C. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 6, p. 254-7, Jun 2002

WAGNER, G. K.; PESNOT, T. Glycosyltransferases and their assays. **Chembiochem**, v. 11, n. 14, p. 1939-49, Sep 24 2010

WATANABE, M. et al. Discrete Distribution of binding sites for Dolichos biflorus agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 7, p. 779-80, Jul 1981

WU, C. K. et al. Galectin-3 level and the severity of cardiac diastolic dysfunction using cellular and animal models and clinical indices. **Sci Rep**, v. 5, p. 17007, 2015

ZAUNER, G. et al. Glycoproteomic analysis of antibodies. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 4, p. 856-65, Apr 2013

ZINGALES, B. et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-4, Nov 2009

Lista de sites visitados:

Organização das Nações Unidas – WHO-2015

<http://www.cazy.org/GH33.html>