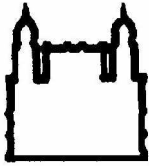




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS POR *Trypanosoma cruzi*:
ALGUNS ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITO-
HOSPEDEIRO ENVOLVENDO O ÁCIDO SIÁLICO
E A TRANS-SIALIDASE**

ANA LUCIA MORENO AMOR

**Salvador - Bahia - Brasil
2002**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**INFECÇÃO DE CAMUNDONGO POR *TRYPANOSOMA
CRUZI*: ALGUNS ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITO-
HOSPEDEIRO ENVOLVENDO O ÁCIDO SIÁLICO E A
TRANS-SIALIDASE**

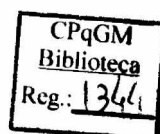
ANA LÚCIA MORENO AMOR

Orientador: Lain Pontes de Carvalho

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental.

Salvador - Bahia

2002



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

A524i Amor, Ana Lúcia Moreno
Infecção de camundongos por *Trypanosoma cruzi*: alguns aspectos da interação parasito-hospedeiro envolvendo o ácido siálico e a trans-sialidase / Ana Lúcia Moreno Amor. - Salvador: Universidade Federal da Bahia / CPqGM / FIOCRUZ, 2002. 56p.:il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia, 2002.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Camundongos. 3. Ácido siálico. 4. Trans-sialidase. I. Título.

CDU 599.323.4: 54-32

PHL
UFV 1344
06.12.00

599.323.4:54-32
A 524 i

**INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS POR *TRYPANOSOMA CRUZI*: ALGUNS ASPECTOS
DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO ENVOLVENDO O ÁCIDO
SIÁLICO E A TRANS-SIALIDADE.**

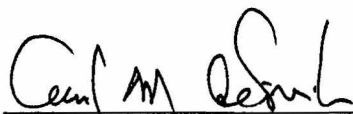
ANA LÚCIA MORENO AMOR

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Denise Carneiro Lemaire
Prof. do PPGIM
ICS-UFBA



Dr. Luiz A. R. de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM- FIOCRUZ



Dr. Lain P. de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM- FIOCRUZ

“São os que conhecem pouco, e não os que conhecem muito, os que afirmam tão positivamente que este ou aquele problema nunca será solucionado pela ciência.”

(Charles Darwin)

**“... Não é belo todo e qualquer mistério?
O maior segredo é não haver mistério algum...”.**

(Renato Russo)

A Deus

*“Quem me dera, ao menos uma vez, fazer
com que o mundo saiba que Seu nome
está em tudo, e mesmo assim ninguém
lhe diz ao menos obrigado.”*

(Renato Russo)

**Aos meus pais, pelo apoio, confiança e
amparo nas horas mais difíceis.**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Lain Pontes de Carvalho pela orientação, ensinando-me com seriedade a arte de fazer Ciência, transmitindo-me segurança para chegar até o final.

A Dra. Neuza Maria Alcântara Neves pela co-orientação nessa dissertação e orientação no Programa PROCESS (Projeto: “Ampliação do acervo de parasitos para as disciplinas do Setor de Parasitologia, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA”), bem como pela confiança recebida durante a pós-graduação, seus conselhos e conhecimentos mostraram-me a certeza de que só estou começando e que é preciso continuar.

Aos Drs. Marcelo Ramos da Fonseca e Josmara Fregoneze, primeiros orientadores de iniciação científica que me despertaram o interesse pela docência e pesquisa.

Ao Dr Sérgio Schenkman e aos companheiros do Laboratório de Biologia Celular/Escola Paulista de Medicina, em especial a Maria Carolina Elias-Sabbaga, pela orientação na realização da técnica de quantificação do DNA por cintilografia.

Ao Dr. Haruki Uemura / Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, por ceder as proteínas recombinantes (trans-sialidases ativa e inativa), utilizadas nos ensaios de ligação.

Aos meus companheiros do LIMC (Elivani, Sérgio, Lenita, Márcia, Adriana, Cláudia Vale, Cláudia Santana, Marcelo, Manoel, Hilton, Natanael, Fábio, Daniela, Marcos Fiúza, Paulo, Flávia, Ricardo, Patrícia, Érica, Virgínia, Sandrinha, Tiago, Pedro, Rute, Antonedson, Stella, Paola, Lílian e Moacir) que, mesmo quando os resultados não eram os esperados, incentivaram-me a prosseguir, acreditando no sucesso desse trabalho, dando-me sempre uma palavra de conforto e coragem, com o bom-humor e alegria peculiares a eles.

Ao Dr. Washington Luís dos Santos (por ceder o fotomicroscópio, quando necessário), Djalma Carvalho (no auxílio com os cortes para imunohistoquímica realizados no criostato), Márcio Rodrigues (na análise dos reagentes feita através da técnica de “Western blot”) e Marco Silvany (na análise dos reagentes feita através da técnica de dot-Elisa e apoio na construção de gráficos).

Aos colegas e professores do mestrado, pela paciência nas horas mais difíceis e pelos conselhos pertinentes e oportunos.

À Sra. Tânia de Farias, Sr. Itamar Crispim e Sr. Mário Filho pela documentação fotográfica desse material e de tantos outros.

Às bibliotecárias Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio e Adelvane Boa-Morte pela preciosa ajuda na normatização da dissertação e das referências bibliográficas, às funcionárias Sr^a Edite Silva Santos e Evany Araújo, pelas palavras de incentivo e paciência demonstradas na utilização da fotocopadora.

À secretária da Pós-Graduação, Sra. Rosália Meires Silva, pelo constante incentivo.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, inicialmente pelo programa PROCESS, e depois viabilizando uma dedicação integral para a execução do trabalho. Ao Dr. Manoel Barral-Netto por aproximar-me deste programa, fazendo com que me apaixonasse pela imunoparasitologia, descobrindo a linha de pesquisa para esta dissertação.

Aos componentes da comissão examinadora desta dissertação composta pelos Drs. Lain Pontes-de-Carvalho, Denise Lemaire, Luís Antônio de Freitas e Eduardo Ramos pelas sugestões enriquecedoras.

A todos os companheiros do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, família e colegas diversos, presentes ou não, que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito deste estudo, minha sincera e especial gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O PARASITO E A DOENÇA DE CHAGAS - NOÇÕES GERAIS	1
1.2 A PENETRAÇÃO DO <i>T. CRUZI</i> NA CÉLULA HOSPEDEIRA.....	3
1.3 O ÁCIDO SIÁLICO E SUAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS.....	4
1.4 A TRANS-SIALIDASE DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 JUSTIFICATIVAS	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 CAMUNDONGOS	13
4.2 ESTUDO DO POSSÍVEL EFEITO DA DESSIALILAÇÃO DE CAMUNDONGOS <i>IN VIVO</i> NO PARASITISMO PELO <i>T. CRUZI</i>	14
4.2.1 Dessialilação do compartimento intravascular e infecção de camundongos por <i>T. cruzi</i>.....	14
4.2.2 Quantificação do DNA do <i>T. cruzi</i> no sangue e tecidos de camundongos BALB/c	15
4.3 INVESTIGAÇÃO DA LIGAÇÃO DA TS A TECIDO CARDÍACO.....	17
4.3.1 Seções de coração.....	17
4.3.2 Trans-sialidase recombinante	18
4.3.3 Preparo e avaliação do anticorpo monoclonal anti-TS.....	20
4.3.4 Preparo de reagente para bloqueio da reação do preparado de anticorpo anti-TS a coração de camundongo	23
4.3.5 Ensaio da ligação da trans-sialidase a tecido cardíaco	23
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25

5	RESULTADOS	27
5.1	A EFICÁCIA DA DESSIALILAÇÃO <i>IN VIVO</i>	27
5.2	SAÍDA DE <i>T. CRUZI</i> DO COMPARTIMENTO INTRAVASCULAR DESSIALILADO.....	27
5.3	TROPISMO DO PARASITO PARA DIFERENTES TECIDOS.....	31
5.4	MORTALIDADE DE ANIMAIS COM O COMPARTIMENTO INTRAVASCULAR DESSIALILADO OU NÃO, INFECTADO INTRAVENOSAMENTE POR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	34
5.5	INVESTIGAÇÃO DA LIGAÇÃO DA TRANS-SIALIDASE A TECIDO CARDÍACO.....	34
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÕES	40
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpo
BSA	albumina sérica bovina
cpm	cintilações por minuto
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
C-terminal	domínio carboxi-terminal
DAB	3,3 diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade ótica
DP	desvio padrão
Dot-ELISA	ensaio imunoenzimático
EDTA	tetra acetato de etilenodiamino
Fn-3	fibronectina III
Gal	galactose
Gp	glicoproteína
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HEPES	N - [2 – hydroxietil] piperazina – N' - [2-ácido etanolsufônico]
His	histidina
Ig	imunoglobulina
iv	intravenoso
kDa	quilodalton
LIMC	Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
MK2	linhagem celular proveniente de epitélio de rim de macaco
M39	anticorpo monoclonal anti-domínio carboxi-terminal da molécula de TS
N-terminal	domínio amino-terminal

PBS	Solução de salina tamponada com fosfato a 150 mM, pH 7,4
PCR	reação da polimerase em cadeia
PEG	polietilenoglicol
PMSF	fluoreto de fenilmetil sulfonil
SAPA	antígeno solúvel da fase aguda da doença de Chagas
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	cromatografia por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
Ssp-3	epitopo sialilado de glicoproteínas de membrana do <i>T. cruzi</i>
T20	"Tween 20"
Tris	tri (hidroximetil-amino) metano
TS	trans-sialidase
TSa	trans-sialidase ativa
TSe	trans-sialidase expressa em epimastigotas
TSi	trans-sialidase inativa
TS-H6	proteína recombinante contendo a região C-terminal da TS
TS-H32	proteína recombinante contendo a região inativa da TS
TS-154	proteína recombinante contendo a região ativa da TS
Tyr	tirosina
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (A) Trans-sialidase do estágio tripomastigota do *T. cruzi*. 19
(B) Formas recombinantes da trans-sialidase expressas em *E. coli*.
- Figura 2** – Reatividade do anticorpo monoclonal M39 em “Western blot”, 22
utilizando-se como antígeno lisado de tripomastigotas de *T. cruzi*.
- Figura 3** – Tecido cardíaco de camundongo nude infectado submetido a 26
ensaio para padronização da reação de imunoperoxidase com anticorpo monoclonal anti-TS de *T. cruzi*.
- Figura 4** – Avaliação do grau de sialilação em tecido cardíaco de 28
camundongos (a) dessialilados com sialidase de *Vibrio cholera* e (b) não dessialilados (tratados com salina).
- Figura 5** – Parasitemia em camundongos dessialilados e não dessialilados 30
infectados com 10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana.
- Figura 6** – Semi-quantificação do DNA parasitário em tecidos de 33
camundongos BALB/c com compartimento intravascular dessialilados ou não-dessialilados infectados com 10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana.
- Figura 7** – Ligação de trans-sialidase recombinante a tecido cardíaco de 35
camundongo nude, evidenciada pela técnica de imunoperoxidase.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Cinética da parasitemia de camundongos BALB/c dessialilados e não dessialilados infectados com 10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana. 29
- Tabela 2** – Semi-quantificação do DNA parasitário nos órgãos e sangue de camundongos BALB/c dessialilados ou não dessialilados infectados com 10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana. 32

RESUMO

INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS POR *TRYPANOSOMA CRUZI*: ALGUNS ASPECTOS DA INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO ENVOLVENDO O ÁCIDO SIÁLICO E A TRANS-SIALIDASE. ANA LÚCIA MORENO AMOR.

O ácido siálico atua em diversos fenômenos biológicos, podendo exibir um efeito potenciador da infecção de células de mamíferos por *T. cruzi in vitro*. Células deficientes em ácido siálico são menos infectadas por tripomastigotas de *T. cruzi*, e esse fenômeno é revertido pela sialilação destas células. Neste trabalho investigou-se o possível papel do ácido siálico na migração do *T. cruzi* do espaço intravascular e no tropismo desses parasitos a diferentes órgãos. Camundongos BALB/c foram dessialilados com sialidase de *Vibrio cholera* antes de infectá-los intravenosamente com tripomastigotas. Amostras de sangue foram coletadas e retirados diversos órgãos 48 horas pós-infecção. A parasitemia foi mensurada através de hemocitômetro e o DNA parasitário nos órgãos quantificado através de hibridização com uma sonda marcada com ^{32}P , correspondendo a um segmento de DNA satélite do *T. cruzi*. A saída dos parasitos da circulação e o tropismo para diferentes tecidos foi semelhante em animais dessialilados ou não. Foi também investigado se trans-sialidases (TS; enzima que transfere ácido siálico de glicoproteínas do hospedeiro para moléculas da membrana parasitária), com ou sem atividade enzimática, ligam-se a tecido cardíaco utilizando-se uma reação de imunoperoxidase. Foram usados como reagentes TS recombinante (ativa, inativa e apresentando apenas o domínio C-terminal) e um anticorpo monoclonal anti-TS. Foi observada coloração do tecido tanto nos cortes incubados com TS ativa quanto com a inativa e ausência de coloração quando incubado com o fragmento correspondendo ao domínio C-terminal da molécula de TS. Nossos achados com a dessialilação sugerem que o ácido siálico não é um ligante envolvido na saída do *T. cruzi* do compartimento intravascular. A ligação da TS ao coração se dá por sua região catalítica, independentemente de atividade enzimática.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*. Camundongo. Ácido siálico. Trans-sialidase.

ABSTRACT

INFECTION OF MOUSE BY *TRYPANOSOMA CRUZI*: SOME ASPECTS OF PARASITE-HOST INTERACTION INVOLVING SIALIC ACID AND TRANS-SIALIDASE. ANA LÚCIA MORENO AMOR

The sialic acid acts in several biological phenomena, and it could exhibit an enhancing effect in the invasion of host cells by *T. cruzi*. Sialylated molecules in the host cells might be important for invasion since mutant cell lines that express less sialic acid are poorly invaded and this is restored by their resialylation. To study the possible role of sialic acid in the migration of the *T. cruzi* from intravascular space to different tissues, the intravascular space of BALB/c mice was desialylated with sialidase of *Vibrio cholera* followed by intravenous infection with *T. cruzi* trypomastigotes. Blood was collected and organs were taken 48 hours post-infection. The parasitemia was measured through hemocytometer and parasitic DNA in the organs quantified through hybridization with a probe labelled with ^{32}P , corresponding to a *T. cruzi* satellite DNA segment. The clearance of the parasites from the circulation was identical in mice desialylated or no desialylated. To investigate if the trans-sialidase (TS; enzyme that transfers sialic acid of glycoproteins of the host to molecules of the parasitic membrane) with or without enzymatic activity binds to heart tissue it came out a immunoperoxidase reaction. When recombinant TS was used (TS active, inactive and the C-terminal domain) and an monoclonal antibody anti-TS, labelling of the tissue was observed in sections incubated with TS active or inactive. Our findings with the mice desialylation demonstrate that the sialic acid is not a ligand involved in the clearance of the *T. cruzi* of the compartment intravascular and suggest to be involved in the tropism of the parasite for the lung, liver and blood of the vertebrate host. The binding of TS to the heart tissue seems to be through out the catalytic domain, but it doesn't depend on enzymatic activity.

Keywords-: *Trypanosoma cruzi*; Mouse; Sialic acid; Trans-sialidase.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PARASITO E A DOENÇA DE CHAGAS – NOÇÕES GERAIS

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é um parasito intracelular obrigatório de muitas espécies de mamíferos, inclusive a humana. É o agente causador da doença de Chagas. Esta doença afeta de 16 a 18 milhões de pessoas no continente americano (MACEDO & PENA, 1998). Dados da Organização Mundial de Saúde revelam que cerca de 90 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção (WHO, 1991). Apesar da doença de Chagas ser conhecida desde o início do século, e seu ciclo elucidado há mais de oito décadas, pouco ainda se conhece a respeito da sua patogênese e aspectos relacionados com o seu controle ainda são objetos de estudos.

A via natural de transmissão de *T. cruzi* para seres humanos é a vetorial, pelas fezes de insetos triatomíneos (barbeiros) infectados (ANDREWS et al., 1987; KOLLIEN & SCHAUB, 2000). Nesses insetos, o *T. cruzi* multiplica-se sob a forma de epimastigotas e diferencia-se em tripomastigotas metacíclicos (ANDREWS et al., 1987; ARAÚJO-JORGE, 1989; SOUZA, 1999).

O protozoário flagelado invade, inicialmente, células do hospedeiro mamífero na forma de tripomastigotas metacíclicos, provenientes do inseto vetor. Dentro das células hospedeiras, os parasitos escapam do vacúolo fagolisossomal para o citoplasma, onde se diferenciam em amastigotas. Após alguns ciclos de multiplicação, estes diferenciam-se por sua vez em tripomastigotas invasivos

(BURLEIGH & ANDREWS, 1995; ANDREWS, 1995; CARVALHO et al., 1999). Saindo das células infectadas, os tripomastigotas podem invadir células adjacentes por migração através da matriz extracelular ou células distantes através da circulação sanguínea (ORTEGA-BARRIA & PEREIRA, 1992; CARRILLO et al., 2000).

O *T. cruzi* pode causar no homem uma doença aguda, permanecer quiescente em uma fase indeterminada ou causar uma doença crônica (MILEI, 1994). Na maioria dos casos de infecção pelo *T. cruzi*, a fase inicial passa despercebida (CHAGAS, 1911). Pode, no entanto, ocorrer uma lesão na porta de entrada do parasito, chamado de chagoma de inoculação, secundariamente a uma resposta inflamatória do hospedeiro. Além disso, nessa fase aguda o indivíduo infectado pode desenvolver febre, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia e, naqueles casos mais exuberantes, miocardite (ANDRADE, 1999) e meningoencefalite, podendo chegar ao óbito (CHAGAS, 1916).

A maioria dos pacientes sobrevive à fase aguda da doença (VERMELHO & MEIRELLES, 1994) e entram na chamada fase indeterminada, que pode durar até o restante da vida do paciente (ANDRADE & ANDRADE, 1979) ou evoluir para a doença de Chagas crônica (MILEI, 1994). A fase indeterminada é assintomática, sendo definida como um prolongado período clinicamente silencioso (ANDRADE, 1999), reconhecido pela presença de infecção pelo *T. cruzi* (xenodiagnóstico e sorologia positiva) na ausência de manifestações clínicas e laboratoriais e de alterações radiológicas do coração e do tubo digestivo.

A fase crônica da doença de Chagas aparece, geralmente, entre 10 e 20 anos após a fase aguda e é caracterizada por manifestações nos aparelhos cardiovascular e digestivo, podendo ocorrer inflamação do tecido cardíaco (miocardite chagásica crônica) (ANDRADE & ANDRADE, 1979), hipertrofia e distensão de órgãos (síndromes de megaesôfago e megacólon) (ANDRADE, 1999). Ela ocorre em aproximadamente 30% dos casos. Nem todos os indivíduos infectados com o *T. cruzi* desenvolvem a forma crônica com lesões, ficando a maioria na forma indeterminada (ANDRADE et al., 1981).

1.2 A PENETRAÇÃO DO *T. CRUZI* NA CÉLULA HOSPEDEIRA

Hoje há um consenso que a adesão e a penetração do *T. cruzi* em células é mediada por moléculas, em geral glicoproteínas presentes na membrana plasmática do parasito (BURLEIGH & ANDREWS, 1995), que reconhecem receptores celulares com os quais estabelecem uma ligação específica, ou seja, estável, independente de temperatura e saturável. Além disto, estas moléculas são em geral estágio-específicas (KIERSZENBAUM & STILES, 1985; RAMIRES et al., 1993).

O grande número de diferentes proteínas de superfície do *T. cruzi* poderia possibilitar uma grande variedade de interações adesivas do *T. cruzi* com estruturas do hospedeiro (OUAISSI, 1986a; OUAISSI, 1986b; LIMA & VILLALTA, 1989; GIORDANO et al., 1994), como com fibronectina, laminina e lectinas de mamíferos (OUAISSI et al., 1986b; GIORDANO et al., 1994; SCHENKMAN et al., 1994b).

Várias glicoproteínas da superfície do *T. cruzi* foram identificadas como ligantes para células dos mamíferos. Aquelas mais estudadas distribuem-se em dois grupos: o da família gênica da GP85 e o das glicoproteínas como mucinas (COLLI & ALVES, 1999; CARMO et al., 1999; ALMEIDA et al., 1999). Motivos de açúcares de glicoproteínas na superfície celular do parasito podem estar envolvidos nesse processo de interação, visto que a remoção destes motivos pode afetar a ligação do parasito a diferentes células hospedeiras (LIMA & VILLALTA, 1989). O reconhecimento de resíduos de ácido siálico em células de mamíferos pelo *T. cruzi* desempenha algum papel na sua internalização. Esta conclusão baseia-se nos achados de que o parasito penetra menos eficientemente em células mutantes, deficientes em ácido siálico, do que em células normais (HALL & JOINER, 1993) e que esse fenômeno é revertido pela sialilação das células mutantes (SCHENKMAN, R et al., 1993; MING et al., 1993), sugerindo que exista um receptor para ácido siálico no *T. cruzi*.

1.3 O ÁCIDO SIÁLICO E SUAS FUNÇÕES BIOLÓGICAS

O ácido siálico é um membro da família dos carboidratos. Ele possui nove moléculas de carbono e é exposto como monossacarídeo terminal nas cadeias polissacarídicas de glicoconjugados (VARKI, 1992; ROTH, 1993) e/ou como polímeros em células eucarióticas e procarióticas (certas bactérias) (CUATRECASAS & ILLIANO, 1971). Normalmente encontra-se ligado covalentemente por ligações α 2-3 ou α 2-6 a moléculas de galactose ou N-acetil-D-galactosamina.

O ácido siálico está envolvido em vários fenômenos biológicos (SCHAUER et al., 1983; TOMLINSON et al., 1992; PILATTE et al., 1993; SCHENKMAN et al., 1994b; CREMONA et al., 1999), como na embriogênese, na manutenção de proteínas plasmáticas e eritrócitos na circulação; no endereçamento leucocitário e como defesa contra o sistema imune, prevenindo a ativação do complemento (VARKI, 1997) e a fagocitose por macrófagos (VARKI, 1997).

O *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico, porém possui uma grande quantidade desta molécula incorporada à sua membrana plasmática (SCHAUER et al., 1983; PEREIRA et al., 1991; FRASCH, 1994), pela ação de uma enzima parasitária, a trans-sialidase (TS).

1.4 A TRANS-SIALIDASE DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

O *T. cruzi* expressa na sua superfície a TS ou β -D-galactosídeo α 2,3-trans-sialidase, que é uma sialil-transferase altamente seletiva em catalisar a transferência de resíduos de ácido siálico acoplados por ligação α 2-3 à galactose para a β -D-galactose terminal de diversos glicoconjugados (SCHENKMAN et al., 1991a e 1991b, 1993; MING et al., 1993; FERRERO-GARCÍA et al., 1993; WILSON et al., 2000). Esta enzima remove resíduos de ácido siálico de glicoconjugados no ambiente e os transfere para o parasito (SCHENKMAN, 1991b).

A TS está presa à membrana do tripomastigota através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo liberada freqüentemente no meio, deixando a âncora de GPI na membrana plasmática do parasito (SCHENKMAN & MORTARA,

1992b). Ela foi inicialmente demonstrada como um antígeno circulante (SAPA = antígeno solúvel da fase aguda da doença de Chagas) em pacientes na fase aguda da doença de Chagas (AFFRANCHINO et al., 1989; PARODI et al., 1992) e, em forma ativa, no soro de camundongos infectados com *T. cruzi* (ALCÂNTARA-NEVES & PONTES-DE-CARVALHO, 1995). Ela é altamente imunogênica e é liberada também em sobrenadantes de cultivo do parasito (SCHENKMAN et al., 1992c; SCUDDER et al., 1993; AGUSTI et al., 1998).

Como todas transglicosidases, as trans-sialidases também exibem atividade de hidrolase (sialidase ou neuraminidase), transferindo ácido siálico para moléculas de água quando na ausência de aceptores adequados (SCHENKMAN et al., 1992c). Na verdade, ela foi primeiramente identificada como uma neuraminidase: foi mostrado que ela remove *in vivo e in vitro* ácido siálico de eritrócitos humanos e, *in vivo*, de células endoteliais e do miocárdio (PEREIRA et al., 1991).

A molécula de TS possui dois domínios principais:

- **domínio amino-terminal (ou catalítico)** → com cerca de 640 aminoácidos (CREMONA et al., 1995), neste domínio está o sítio catalítico da enzima, com cerca de 380 aminoácidos (PEREIRA et al., 1991; POLLEVICK, 1991; UEMURA et al., 1992; CREMONA et al., 1995; BUSCHIAZZO et al., 2000).

- **domínio carboxi-terminal** → contém seqüências repetitivas de 12 aminoácidos (DSSAHSTPSTPA – os SAPA “repeats”) (FERRERO-GARCIA et al., 1993); o número de repetições varia conforme o gene que codificou a molécula (SCHENKMAN et al., 1994b; EGIMA et al., 1996). Esse domínio contém o motivo necessário para ligação da âncora de GPI, pois após as seqüências repetitivas de

12 aminoácidos, há uma extensa região hidrofóbica, similar àquelas encontradas em outras proteínas GPI-ancoradas (SCHENKMAN et al., 1994b). O domínio carboxi-terminal não é essencial para a atividade enzimática; é considerado como a porção imunodominante da molécula de TS, estando envolvido no processo de oligomerização (AFFRANCHINO et al., 1989; SCHENKMAN et al., 1994b; BUSCAGLIA et al., 1999) e no aumento da estabilidade da proteína (BUSCAGLIA et al., 1999).

A TS faz parte da superfamília gênica da trans-sialidase, que abrange quatro famílias caracterizadas principalmente pela existência dos motivos conservados, (KAHN, 1991; PARODI et al., 1992; POLLEVICK, 1993; SCHENKMAN et al., 1994b; LOW & TARLETON, 1997). Dentro dessa superfamília, a família da proteína TS é codificada por aproximadamente 140 genes (CREMONA et al., 1999), que codificam também produtos protéicos inativos (SCHENKMAN et al., 1994a; CREMONA et al., 1995). Estes 140 membros podem ser classificados em três grupos, de acordo com a estrutura e função dos seus produtos. Dois desses grupos (TS e TS I) são expressos por tripomastigotas no inseto vetor e no mamífero, apresentando âncora de GPI (AGUSTI et al., 1998; FRASCH, 2000). Membros desses dois grupos diferem essencialmente em suas regiões N-terminal; o grupo TS tem atividade enzimática, já o grupo TS I não tem esta atividade (CAMPETELLA, 1992). A comparação da seqüência de aminoácidos derivada dos membros enzimaticamente ativo e inativo mostrou que diferenças são restritas a cerca de 20 aminoácidos. Proteínas ativa e inativa contêm Tyr ou His na posição 342, respectivamente (CREMONA et al., 1995).

Membros do terceiro grupo (Ts-e) são expressos por epimastigotas, não apresentam domínio repetitivo SAPA e têm atividade enzimática (FRASCH, 2000).

Dado o possível envolvimento da TS na infecção de mamíferos pelo *T. cruzi*, e a ausência de enzima similar em mamíferos, a TS constitui um alvo atraente para o desenvolvimento de compostos a serem usados no controle da infecção (BUSCHIAZZO et al., 2000). Recentes estudos (RIBEIRÃO et al., 1997; SMITH, 1997) sugeriram que alguns resíduos de aminoácidos no sítio ativo da TS diferem dos de outras sialidases, possibilitando a construção de um inibidor específico. Anticorpos que inibem a atividade TS são produzidos durante infecções naturais e experimentais, e experimentos com vacinas de DNA codificando TS mostraram inibição parcial da infecção por *T. cruzi* (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 1999).

A função exata da TS ainda não foi descoberta no que refere-se à patogênese da doença de Chagas (LAROY, 2000). Foi proposto que a enzima pode funcionar como ligante do parasito para moléculas sialiladas nas células hospedeiras (MING et al., 1993; SCHENKMAN et al., 1994b; ANDREWS, 1995). A TS é uma forte candidata para ser um receptor para o ácido siálico presente nas membranas celulares. Esta hipótese é respaldada pelos seguintes fatos: (i) a TS tem afinidade por substratos sialilados - ela possui sítio (enzimático) de ligação a ácido siálico, interagindo portanto naturalmente com o ácido siálico das células hospedeiras; (ii) a TS é, na sua forma nativa, oligomérica (SCHENKMAN et al., 1992a), o que acarretaria, devido à multivalência, um aumento exponencial da avidéz por ligantes da membrana celular; (iii) tem sido relatado que TS solúvel inibe a entrada do *T.*

cruzi em célula do hospedeiro *in vitro*, presumivelmente por competir com a TS ligada à superfície do tripanossoma (MING et al., 1993).

Por outro lado, como a TS é liberada pelo parasito, ela poderia ligar-se a moléculas de ácido siálico na superfície de células do hospedeiro vertebrado, sensibilizá-las para mecanismos efetores anti-TS e levar à destruição dos tecidos hospedeiros. A ligação de antígenos de *T. cruzi* a células cardíacas e nervosas foi provada em animais infectados por *T. cruzi* (HUDSON, 1981). Alcântara-Neves (1998), demonstrou, *ex-vivo*, por imunoperoxidase, TS ligada a tecido cardíaco de camundongos experimentalmente infectados por *T. cruzi*.

Em uma série de experimentos foi avaliada a possibilidade de TS ligar-se à célula hospedeira. Foi estudada a ligação *in vitro* de TS com células de linhagem mioblástica e mostrou-se que a TS liga-se a célula hospedeira de forma independente do ácido siálico, uma vez que apenas uma sub-população anfifílica (<0,05%) das moléculas de TS ligaram-se a células hospedeiras *in vitro*, e esta ligação ocorreu em células desialiladas, na presença de sialidase, e não foi inibida por sialil-lactose (ALCÂNTARA-NEVES, 1998).

Foi sugerido que a TS pode mediar uma interação parasito-hospedeiro no sangue, possibilitando a migração do parasito para os tecidos através da ligação com moléculas sialiladas do hospedeiro, como sugerido na literatura (MING et al., 1993; SCHENKMAN et al., 1994b).

A TS enzimaticamente inativa é capaz de aglutinar eritrócitos desialilados, mas não eritrócitos normais, o que mostra uma capacidade de ligação a β -galactose terminal (CREMONA, 1999). Esse sítio de ligação à galactose detectado na TS inativa pode ser equivalente ao presente na TS ativa, mas sua estrutura precisa ser melhor estudada.

Outros papéis biológicos propostos para a TS incluem a promoção da invasão de células pelo parasito (SCHENKMAN et al., 1992a), a liberação de tripomastigotas dos fagossomos hospedeiros (HICKS et al., 2000), a defesa contra ativação do sistema complemento (TOMLINSON, 1994). Achados suportam a noção de que a infectividade do tripomastigota é regulada pela aquisição do ácido siálico em sua superfície; sua infectividade é aumentada pela incubação com glicoproteínas contendo ácido siálico (PIRAS, 1983; PIRAS et al., 1987; SCHENKMAN & MORTARA, 1992b). Evidenciou-se a importância da atividade enzimática desempenhada pela TS com a descoberta de um epitopo contendo ácido siálico – o Ssp-3 – resultante da ação da TS. O bloqueio da Ssp-3 com um anticorpo monoclonal limita a infecção de células pelo *T. cruzi*, sugerindo um possível envolvimento deste epitopo na invasão das células de mamíferos (SCHENKMAN et al., 1992a).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o possível papel do ácido siálico na migração do *Trypanosoma cruzi* do espaço intravascular de camundongos BALB/c para diversos tecidos e se moléculas de trans-sialidase sem atividade enzimática ligam-se a tecido cardíaco do hospedeiro vertebrado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar se a dessialilação do compartimento intravascular de camundongos interfere com a saída do *T. cruzi* do sangue circulante para os tecidos.
- Investigar se moléculas de TS recombinante, ativa e inativa, adsorvem a tecido cardíaco de camundongo *in vitro*.

3 JUSTIFICATIVAS

A comprovação de que o *T. cruzi* utiliza o ácido siálico para migrar para diferentes tecidos, como um mecanismo de escape eficiente, abre a perspectiva de modificar-se essa migração através de anticorpos específicos contra o receptor parasitário para ácido siálico. Dependendo do efeito que essa modificação tivesse sobre a evolução da doença, o receptor de ácido siálico poderia ser utilizado como um antígeno importante em uma possível vacina contra a infecção.

A adsorção de antígenos do *T. cruzi* a células cardíacas pode ter relevância na patogênese da doença de Chagas. A determinação do sítio de ligação da TS no tecido cardíaco pode permitir a realização de estudos visando verificar se anticorpos contra esses sítios alteram a patogênese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular.

4.1 CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos singenéticos nude e BALB/c, provenientes do Biotério do CPqGM.

Os camundongos nude foram utilizados como doadores de coração para os ensaios de ligação de moléculas de TS a tecido cardíaco, para que imunoglobulinas do próprio camundongo presente no tecido não se liguem ao conjugado anti-IgG usado, evitando coloração de fundo indesejável.

Os camundongos BALB/c foram utilizados no estudo da dessialilação do compartimento intravascular de camundongos, já que eles são usados em um modelo experimental de doença de Chagas bem estudado (ROSSI et al., 1984).

4.2 ESTUDO DO POSSÍVEL EFEITO DA DESSIALILAÇÃO DE CAMUNDONGOS *IN VIVO* NO PARASITISMO PELO *T. CRUZI*

4.2.1 Dessialilação do compartimento intravascular e infecção de camundongos pelo *T. cruzi*

Para investigar se o reconhecimento de ácido siálico desempenha algum papel na saída do *T. cruzi* do sangue e em sua migração para diferentes órgãos, camundongos BALB/c foram injetados com 100 μ U de sialidase de *Vibrio cholerae* (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianápolis, EUA) ou salina, por via intravenosa, 3, 2, 1 e 0 hora antes e 1 e 2 horas após a infecção intravenosa com 10^7 formas tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*, provenientes de cultivo em células LLC-MK2 (CCL-American Type Cell Culture Collection, Rockville, EUA).

A atividade enzimática do lote de sialidase utilizado foi determinada através da avaliação da dessialilação da substância metilumbeliferil ácido N-acetil neuramínico (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), gerando o fluorógeno metilumbeliferona, conforme descrito na literatura (MEDINA-ACOSTA et al., 1994).

A cinética de desaparecimento dos parasitos do sangue foi determinada pela mensuração da parasitemia através de hemocítômetro. Três camundongos por grupo foram inoculados apenas com os parasitos e mantidos para observar suas sobrevidas.

O grau de dessialilação foi determinado através da marcação de cortes em criostato de tecido cardíaco de camundongo, inoculado com sialidase ou salina (solução aquosa de NaCl 0,9% p/v), utilizando-se 30 µg da lectina de *Maackia amurensis* (Vector Laboratories, Nova Iorque, EUA) (específica para o ácido siálico) em N - [2 - hidroxietil] piperazina - N' - [2-ácido etanolsulfônico] (HEPES / Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 10 mM, pH 7,5, NaCl a 0,15 M e azida a 0,04%. Utilizou-se essa lectina ligada à biotina, e a extravidina ligada a peroxidase. As incubações com a lectina biotinilada, com a extravidina-peroxidase e com o substrato foram feitas como descrito (com anti-imunoglobulina no lugar da lectina) no item 4.3.5.

4.2.2. Quantificação do DNA do *T. cruzi* no sangue e tecidos de camundongos BALB/c

O DNA foi purificado pela técnica de extração com fenol/clorofórmio. Para tal, 100 mg de cada órgão (baço, músculo, rim, pulmão, coração, fígado) e do sangue foi homogeneizado em homogeneizador de tecidos com ponta de teflon, a 4^o C, até que a suspensão ficasse macroscopicamente homogênea. Um volume de 800µl da solução de extração foi utilizado para músculos e um de 1600 µl para os outros órgãos, devido a diferenças de concentração de DNA nesses órgãos. O número de macerações para cada tecido foi padronizado. A extração foi realizada com uma solução contendo: Tris-HCl a 0,01 M, pH 7,4; NaCl a 0,15 M e tetra acetato de

etilenodiamino (EDTA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 0,01 M. Após homogeneização, foram transferidos 500 µl de cada extrato para tubo Eppendorf, adicionando-se 10 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) em água destilada e 10 µl de proteinase K (Speciality Reagent, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, EUA) a 10 mg/ml em água destilada. As amostras foram incubadas por 3 horas a 65° C ou 16 horas a 45° C e, a seguir, precipitadas em fenol/clorofórmio e o DNA ressuspensão em água destilada. A concentração de DNA foi determinada por absorvância a 260 nm, com o uso de espectrofotômetro. Considerou-se satisfatório o grau de pureza correspondente às razões A260 (DNA) / A280 (proteína) de 1,6 a 1,9.

O DNA parasitário foi semi-quantificado através de hibridização com uma sonda radioativa marcada com ³²P, correspondendo a um segmento de DNA satélite da cepa Y ou da cepa Colombiana do *T. cruzi*. As amostras de DNA foram aplicadas em papel de nylon e então hibridizadas com a sonda, segundo metodologia utilizada por Diaz e colaboradores (1992). Por esta técnica, o DNA parasitário, extraído de cada um dos órgãos supracitados e do sangue, foi amplificado por PCR utilizando-se o DNA satélite do *Trypanosoma cruzi*, para realçar a sensibilidade na detecção do parasito no sangue.

As membranas (Zeta-Probe; Bio-Rad, Richmond, CA) foram secas e a radioatividade contada em tubos de cintilação e expressa em cpm (cintilações por minuto, correspondendo a intensidade de hibridização de cada amostra), usando um

contador de radiação beta. Este ensaio de hibridização foi realizado na Escola Paulista de Medicina (Departamento de Biologia Celular), em colaboração com o Dr. Sérgio Schenkman e com a doutoranda Maria Carolina Elias-Sabbaga. A sonda foi gentilmente cedida pela Dra. Carmen Diaz do Departamento de Patologia, New York University Medical Center, Nova Iorque, EUA.

4.3 INVESTIGAÇÃO DA LIGAÇÃO DA TS A TECIDO CARDÍACO DE CAMUNDONGOS

4.3.1 Seções de coração

Coração de camundongos normais ou infectados com *T. cruzi* foram retirados e seccionados longitudinalmente em duas partes. Uma delas foi colocada em moldes de polipropileno, de 1 cm de diâmetro, contendo meio de montagem de tecidos (Tissue-tek, FisherChemical, IL, EUA), mergulhada em 3-metil-butanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), resfriada em nitrogênio líquido e, em seguida, preservada a -70° C. A outra parte foi lavada sucessivamente em banho de salina tamponada com fosfato, a 150 mM, pH 7,2 (PBS), PBS contendo 10% de sacarose (p/v) e PBS contendo 20% de sacarose (p/v), por 30 minutos, duas horas e 16 horas, respectivamente. Estas últimas soluções, hipertônicas, extrairiam água do espaço intracelular, facilitando a lavagem de proteínas adsorvidas às células. Em seguida os tecidos foram montados e congelados. Seções de 5 a 6 μ m de espessura foram obtidas com o uso de criostato, utilizando a temperatura de -30° C. As seções de tecidos foram adsorvidas a lâminas de vidro, previamente tratadas com polilisina

(Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA), e utilizadas na realização do método de imunohistoquímica para detecção de TS ligada a tecido cardíaco.

4.3.2 Trans-sialidase recombinante

As proteínas recombinantes foram obtidas pelo Dr. Haruki Uemura (Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Japão) a partir da expressão do vetor pET21 em *E. coli*, contendo individualmente insertos de TS ativa (TS-154), TS inativa (TS-H32) e do domínio C-terminal da TS (TS-H6) (Fig. 1).

As proteínas foram mantidas em uma solução de Tris-HCl a 25 mM, pH 7,4, contendo NaCl a 0,5 M e EDTA a 0,1 M.

A



B

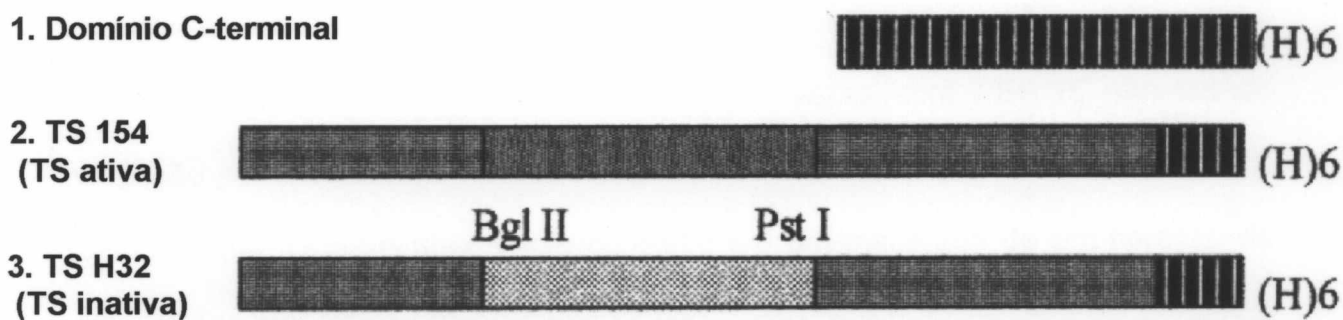


Figura 1 – A) Trans-sialidase do estágio tripomastigota do *T. cruzi*.

B) Formas recombinantes da trans-sialidase expressas em *Escherichia coli*.

4.3.3 Preparo e avaliação do anticorpo monoclonal anti-TS

Para estudo de ligação de TS ao tecido cardíaco, com técnicas de imunohistoquímica, foi utilizado como anticorpo primário o monoclonal anti-trans-sialidase (M39) (cedido pelo Dr. Sérgio Schenkman, Escola Paulista de Medicina, São Paulo), previamente incubado com corações de camundongos BALB/c e Suíço normais. A absorção de líquido ascítico contendo M39 com esses corações foi realizada com dois absorventes. O primeiro foi preparado a partir da mistura por inversão de macerados de corações de um camundongo BALB/c e um camundongo Suíço, normais, com 0,25 ml de PBS e 0,25 ml de paraformaldeído a 4%, à temperatura ambiente durante 8 minutos. O precipitado obtido por centrifugação a 20.000 g durante 5 minutos foi lavado quatro vezes com PBS (5 minutos de incubação por cada lavagem), e ressuspenso com 0,25 ml de PBS contendo 0,05% (p/v) de NaN_3 . O outro absorvente consistiu em um macerado de um coração de camundongo BALB/c e um de camundongo Suíço, em 0,25 ml de PBS contendo NaN_3 a 0,1% e inibidores de proteases nas seguintes concentrações finais [leupeptina, 5 $\mu\text{l/ml}$; PMSF, 1mM; E-64 (Sigma Chemical Co., Saint Louis, EUA), 4 mM e EDTA, 2 mM]. Foi incubado por 2 horas, a 4° C, 200 μl de ascite contendo NaN_3 a 0,1%, 50 μl de uma mistura em partes iguais dos dois absorventes (v:v) e 25 μl de polietilenoglicol (PEG; Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany) a 30% (p/v). Essa mistura foi centrifugada a 20.000 g, por 8 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 50 μl da mistura de absorventes, repetindo-se

então os processos de incubação e precipitação. O preparado contendo o M39 absorvido foi conservado na presença de NaN_3 a 4° C até o uso.

A reatividade do líquido ascítico contendo o M39 foi verificada através de “Western blot” contra lisado de tripomastigotas de *T. cruzi* de acordo com Alcântara-Neves & Pontes-de-Carvalho (1995). Quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a TS migra como diversas bandas nas faixas de 100 a 220 kDa (SCHENKMAN et al., 1992c). Observou-se o padrão típico de 6-7 bandas com peso molecular acima de 160 kDa, correspondente à TS (Fig. 2).

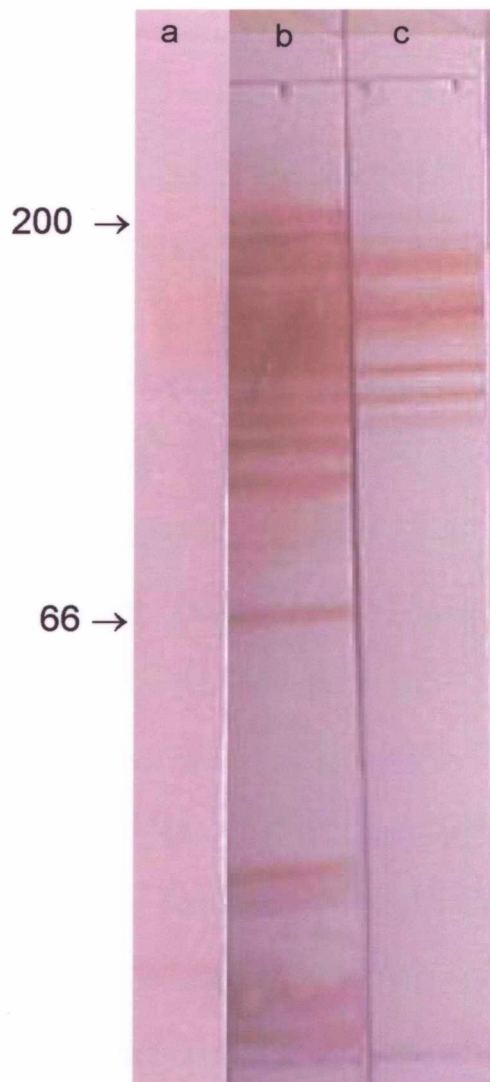


Figura 2 – Reatividade do anticorpo monoclonal M39 em “Western blot”, utilizando-se como antígeno lisado de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

O lisado, após ser submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, foi transferido para papel de nitrocelulose e incubado com um dos seguintes reagentes:

- (a) soro de camundongo normal (controle negativo);
- (b) soro de camundongo infectado por *Trypanosoma cruzi* na fase crônica (controle positivo);
- (c) M39 absorvido em coração de camundongo normal.

Os números à esquerda representam as posições de proteínas padrões com os pesos moleculares indicados (em kDa).

4.3.4. Preparo de reagente para bloqueio da reação do preparado de anticorpo anti-TS a coração de camundongo

Uma suspensão contendo 1 g de fígado de camundongo BALB/c em 1 ml de salina foi preparada em homogenizador de tecido e, em seguida, incubada sobre gelo durante 5 minutos. Foi adicionada acetona a -20°C na proporção de 4 ml de acetona para 1 ml da suspensão, incubando-a a 0°C por 30 minutos, com agitações ocasionais. A solução formada foi centrifugada a 3800 g durante 20 minutos, e o precipitado coletado, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em acetona a -20°C , na proporção de 4 ml de acetona para 1 ml do precipitado e incubado a 0°C por 10 minutos. A suspensão foi filtrada em papel de filtro; o filtrado espalhado, deixando-o secar à temperatura ambiente. O filtrado foi finalmente pulverizado, peneirando-o para a obtenção de um pó, o qual foi mantido à temperatura ambiente até o uso.

4.3.5 Ensaio da ligação da trans-sialidase a tecido cardíaco

Utilizou-se uma técnica de imunoperoxidase empregando-se o anticorpo monoclonal M39 pré-absorvido com coração, um conjugado anti-IgG de camundongo biotinizado (Amersham Co., Arlington Heights, IL, EUA) e extravidina-peroxidase (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), tendo como substrato peróxido de hidrogênio e, como cromógeno, a diaminobenzidina (DAB; Pierce, Rockford, IL, EUA).

Diferentes diluições dos diversos reagentes foram testadas em cortes de coração de camundongos nude infectados por *T. cruzi*, para determinar diluições que corassem os ninhos parasitários, mas não corassem tecido cardíaco normal. O anticorpo M39 foi testado a 1/100 e 1/200. Cada uma dessas diluições foi testada com anti-IgG biotinizada a 1/200, 1/500 e 1/1000, sendo os cortes de coração, pré-incubados com cada uma dessas combinações, por sua vez incubados com extravidina-peroxidase nas diluições de 1/100 e 1/400. Todos estes reagentes foram diluídos em PBS contendo leite desnatado a 5%.

Optou-se pela diluição do M39 a 1/200, do anti-IgG biotinizado a 1/500 e da extravidina-peroxidase a 1/400, em virtude de haver sido a combinação que produziu coloração menos intensa no tecido sem ninhos parasitários, corando nitidamente esses ninhos (Fig. 3).

Cortes de coração de camundongos nude não infectados foram incubados com as proteínas recombinantes distintas, citadas no item 4.3.2, diluídas em tampão Tris-HCl a 25 mM, pH 7,4, contendo NaCl a 0,5 M e EDTA a 0,1 M ou somente com o tampão (controle negativo), durante 4 horas à 37° C, em câmara úmida. Os cortes foram lavados em seguida com PBS (quatro lavagens de 5 minutos cada). Eles foram então fixados em PBS contendo 4% de paraformaldeído por 10 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com PBS contendo azida a 0,3% e H₂O₂ a 0,02%, por 45 minutos. Possíveis sítios de adsorção inespecífica foram bloqueadas por 30 minutos, com PBS contendo albumina sérica bovina a 1% (BSA; Sigma

Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA), azida a 0,05% e pó de fígado a 10 mg/ml. Após o bloqueio, os cortes foram incubados sucessivamente com o anticorpo primário, anticorpo anti-IgG biotinilado, extravidina-peroxidase e com o cromógeno (diaminobenzidina, Pierce, Rockford, IL, EUA) diluído a 1/10 em tampão contendo o substrato, H₂O₂. A reação foi interrompida por lavagem com água destilada, após o aparecimento de cor no controle positivo a olho nu.

A não ser quando especificado no texto, todas as incubações foram feitas por 45 minutos, e entre elas foram realizadas lavagens consistindo em três incubações por 5 minutos com PBS. As lâminas foram finalmente contracoradas com hematoxilina, e montadas com lamínulas em bálsamo do Canadá.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados deste estudo foi realizada utilizando o programa GraphPad-Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA).

Na análise dos tecidos dessialilados e não dessialilados realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

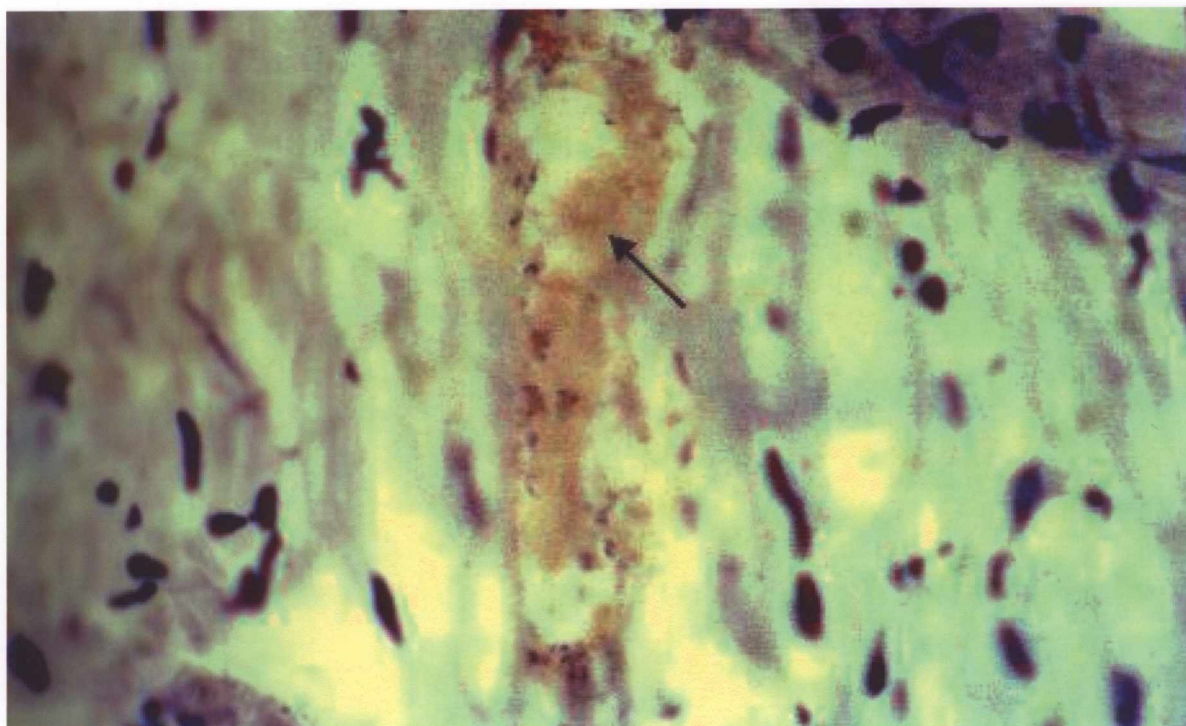


Figura 3 – Tecido cardíaco de camundongo nude infectado com *T. cruzi* submetido a ensaio para padronização da reação de imunoperoxidase com anticorpo monoclonal anti-TS de *T. cruzi*.

Utilizou-se a combinação de diluições (anticorpo monoclonal anti-trans-sialidase M39 a 1/200, anti-IgG biotilado a 1/500 e extravidina-peroxidase a 1/400), que produziu melhor visualização dos ninhos parasitários (seta), como referido em Material e Métodos. Aumento de 400x.

5 RESULTADOS

5.1 EFICÁCIA DA DESSIALILAÇÃO *IN VIVO*

A marcação do tecido cardíaco com a lectina de *Maackia amurensis* mostrou que o tecido cardíaco foi dessialilado pelo tratamento dos camundongos com sialidase (Fig. 4).

5.2 SAÍDA DE *T. CRUZI* DO COMPARTIMENTO INTRAVASCULAR DESSIALILADO

A redução na parasitemia não é conclusivo de que os parasitos estejam migrando para os tecidos.

A cinética de redução do número de parasitos do sangue foi similar em animais com compartimento intravascular dessialilado ou não (Tabela 1 e Fig. 5). A única diferença estatisticamente significativa observada foi no tempo de duas horas após a inoculação dos parasitos, quando um número menor de parasitos foi observado nos animais tratados com sialidase ($p < 0,05$). A percentagem de parasitos que tinha migrado do sangue duas horas após a injeção dos parasitos nos camundongos injetados com sialidase e com salina foi de 92,7% e 81,3%, respectivamente. Essa diferença, no entanto, desapareceu quatro horas após, quando a percentagem de parasitos que tinham deixado o sangue foi de 99,9% em ambos os grupos.

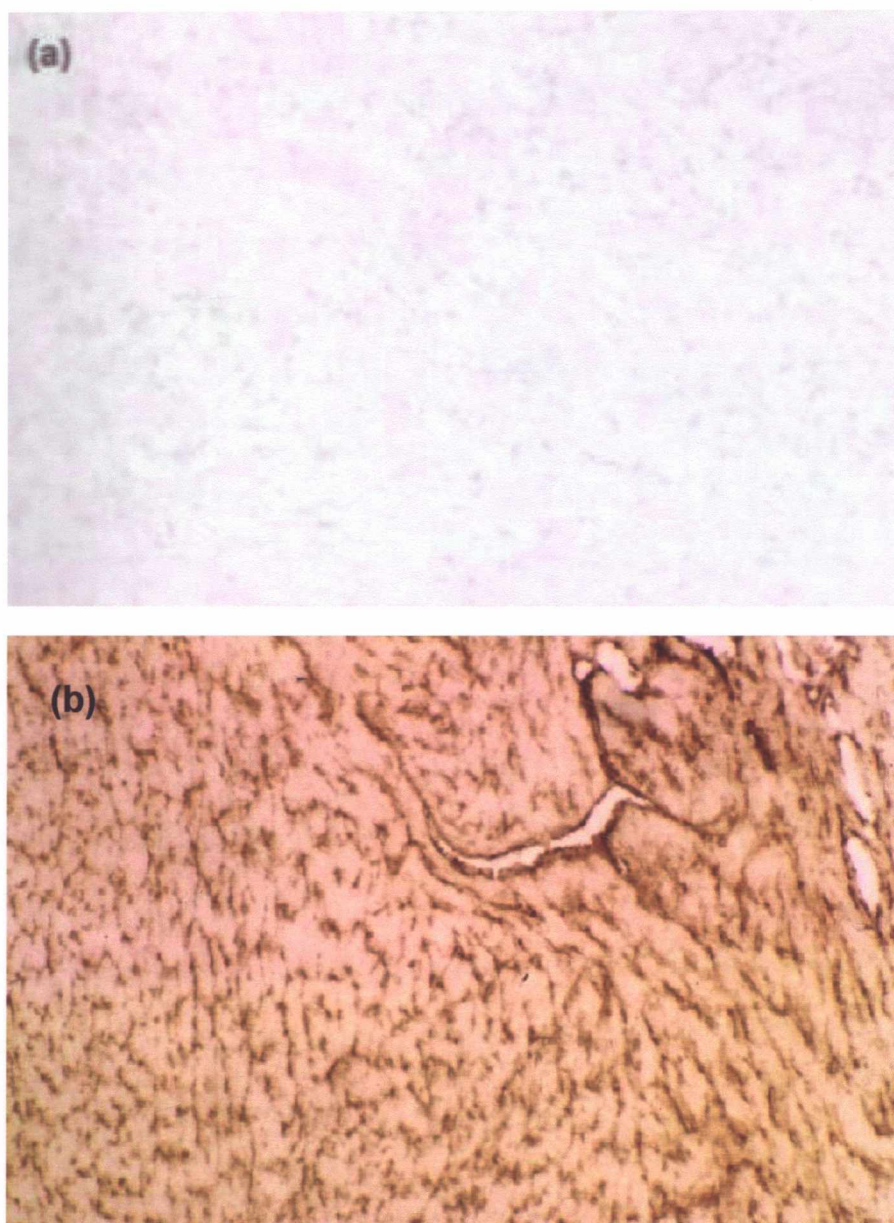


Figura 4 - Avaliação do grau de sialilação em tecido cardíaco de camundongos dessialilados com sialidase de *Vibrio cholera* (a) e não dessialilados, tratados com salina, (b). Utilizou-se a lectina de *Maasia amurensis* ligada à biotina, como marcador específico para ácido siálico, em uma reação de imuno-peroxidase, como referido no Material e Métodos. Nota-se em (b) a forte coloração de membranas celulares, devido a presença do ligante (ácido siálico) para a lectina. Aumento de 200x.

Tabela 1 – Cinética da parasitemia em camundongos BALB/c dessialilados e não dessialilados infectados com 10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana.

Tempo*	Salina		Sialidase	
	Nº de parasitos	%	Nº de parasitos	%
20 segundos	$5,9 \pm 0,2^{**}$	100,0	$5,3 \pm 0,9$	100,0
2 horas	$1,1 \pm 0,2$	18,7	*** $0,38 \pm 0,1$	7,2
6 horas	$0,3 \pm 0,1$	0,1	$0,25 \pm 0,1$	0,1

* Tempo decorrido após injeção do parasito.

** Média dos resultados obtidos com 6 camundongos x 10^6 por ml de sangue \pm o desvio padrão.

*** Indica diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre o número de parasitos nos animais tratados com sialidase ou salina quando submetidos à análise estatística através do teste de Mann-Whitney.

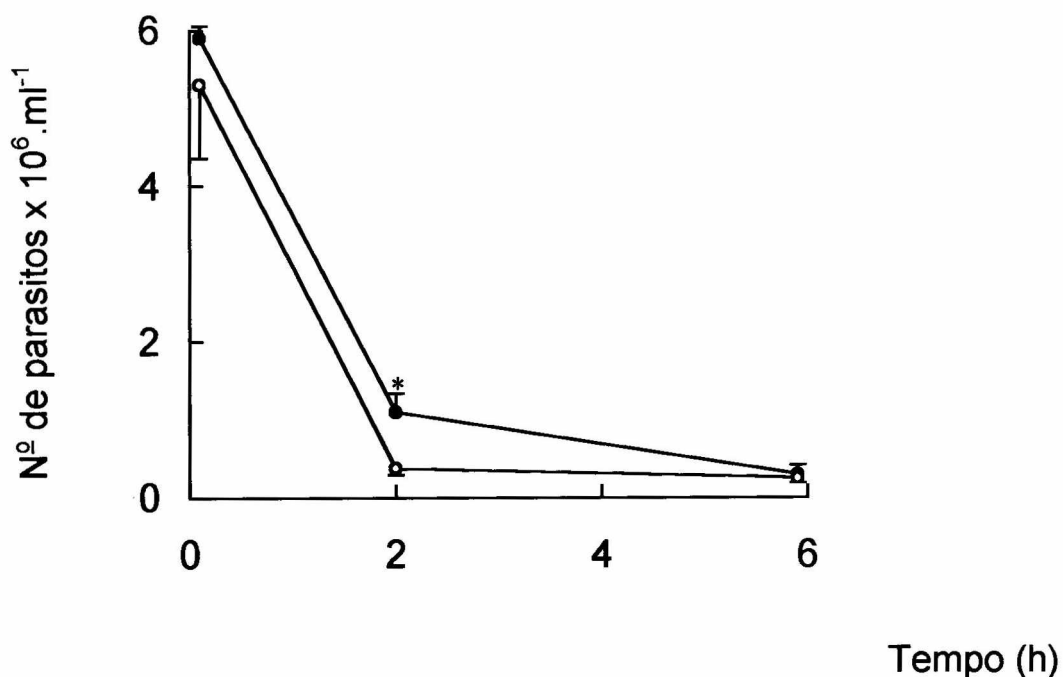


Figura 5 – Parasitemia em camundongos dessialilados e não dessialilados infectados com 10^7 tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana.

Os dados são apresentados como média do número de parasitos x 10^6 por ml de sangue (determinado por contagem em hemocitômetro). O asterisco indica a diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre o grupo dessialilado (●) com o seu respectivo controle (○) quando submetidos à análise estatística através do teste de Mann-Whitney. As linhas verticais representam o desvio padrão das médias dos resultados obtidos de 5 animais.

5.3 TROPISMO DO PARASITO PARA DIFERENTES TECIDOS

Quando foi utilizada uma sonda radioativa marcada com ^{32}P correspondendo a um segmento de DNA satélite do *T. cruzi* da cepa Y, obteve-se valores muito baixos, próximos ao valor basal (dados não mostrados). Por outro lado, usando-se uma sonda radioativa correspondendo a um segmento de DNA satélite do *T. cruzi* da cepa Colombiana, marcada com ^{32}P , resultados claros foram obtidos, com contagens por minuto na ordem de 10^6 (aproximadamente 10^4 vezes maiores que o valor basal; Tabela 2 e Fig. 6).

Novamente os resultados obtidos nos camundongos dessialilados e não-dessialilados foram semelhantes (Tabela 2 e Fig. 6), encontrando-se números menores de parasitos apenas no pulmão, fígado e sangue de animais tratados com sialidase (Fig. 6).

Tabela 2 – Semi-quantificação do DNA* parasitário nos órgãos e sangue de camundongos BALB/c dessialilados ou não dessialilados infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana.

TECIDO	ANIMAIS INFECTADOS PRÉ-TRATADOS COM	
	SALINA (n=6)	SIALIDASE (n=6)
Baço	8,2914 ± 1,0602**	6,2511 ± 1,6386
Músculo esquelético	2,2605 ± 0,3359	1,9602 ± 0,1718
Rim	2,4079 ± 0,7646	2,5378 ± 0,7911
Pulmão***	2,2971 ± 0,2977	1,7302 ± 0,2997
Coração	2,4386 ± 0,4761	2,0533 ± 0,7827
Fígado***	8,4798 ± 1,8911	6,0027 ± 1,9082
Sangue***	4,7000 ± 1,0159	3,4039 ± 0,3291

* O DNA do tecido foi hibridizado com sonda radioativa marcada com ^{32}P contendo um segmento de DNA satélite da cepa Colombiana.

** Os dados são expressos em média \pm desvio padrão de contagens por minuto $\times 10^6$.

*** ($p < 0,05$) indica diferença estatisticamente significativa entre o número de parasitos nos animais tratados com sialidase ou salina quando submetidos à análise estatística através do teste de Mann-Whitney.

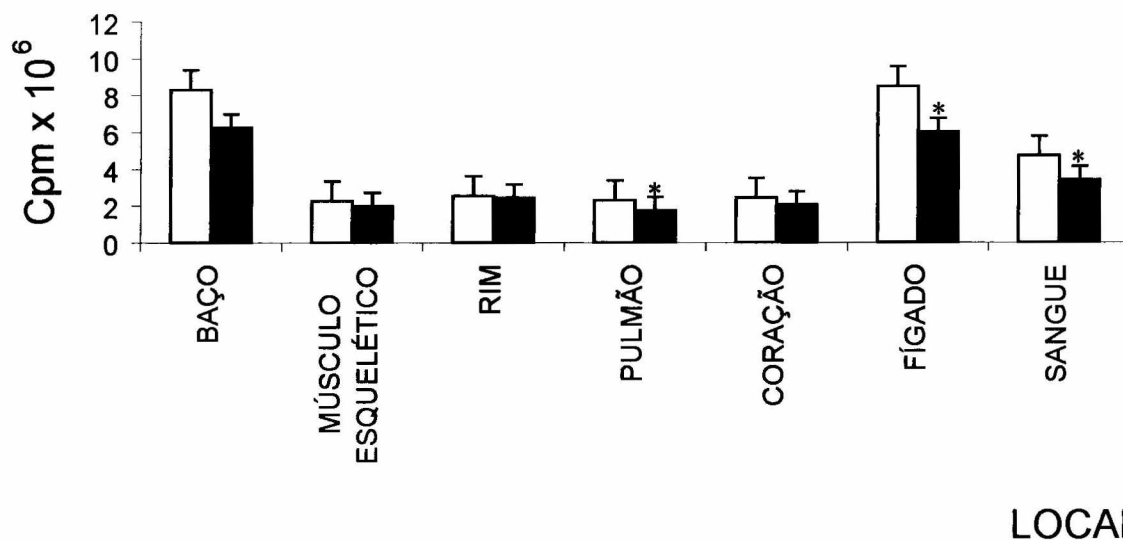


Figura 6 – Semi-quantificação de DNA parasitário em tecidos de camundongos BALB/c com compartimento intravascular dessialilado ou não dessialilado infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Colombiana.

As alturas das colunas correspondem a média das contagens por minuto x 10⁶ obtidas com a hibridização de uma sonda para DNA parasitário, radiomarcada, em amostras de DNA tecidual, como descrito em Material e Métodos. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo dessialilado (■) e o seu respectivo controle (□), quando submetidos à análise estatística através do teste de Mann-Whitney. As linhas verticais representam os desvios padrões da média dos resultados individuais obtidos de 6 animais.

5.4 MORTALIDADE DE ANIMAIS COM O COMPARTIMENTO INTRAVASCULAR DESSIALILADO OU NÃO, INFECTADOS INTRAVENOSAMENTE POR *T. CRUZI*

Os animais infectados com *T. cruzi* morreram com 7 ou 9 dias de infecção, independentemente da dessialilação do compartimento intravascular (dados não mostrados). Este resultado foi observado em um experimento com três animais por grupo.

5.5 INVESTIGAÇÃO DA LIGAÇÃO DA TRANS-SIALIDASE A TECIDO CARDÍACO

No uso da técnica de imunohistoquímica para investigar a ligação de TS a tecido cardíaco, foi observada ligação a células musculares cardíacas tanto nos cortes incubados com TS ativa recombinante (Fig.7c), quanto nos cortes incubados com TS inativa recombinante (Fig. 7d). Nos cortes incubados com TS apresentando apenas o domínio C-terminal (Fig. 7a), a coloração do tecido cardíaco foi semelhante ao controle negativo (Fig. 7b).

A possibilidade de um efeito patogênico modulável dessa ligação é muito interessante e abre perspectivas para uma intervenção.

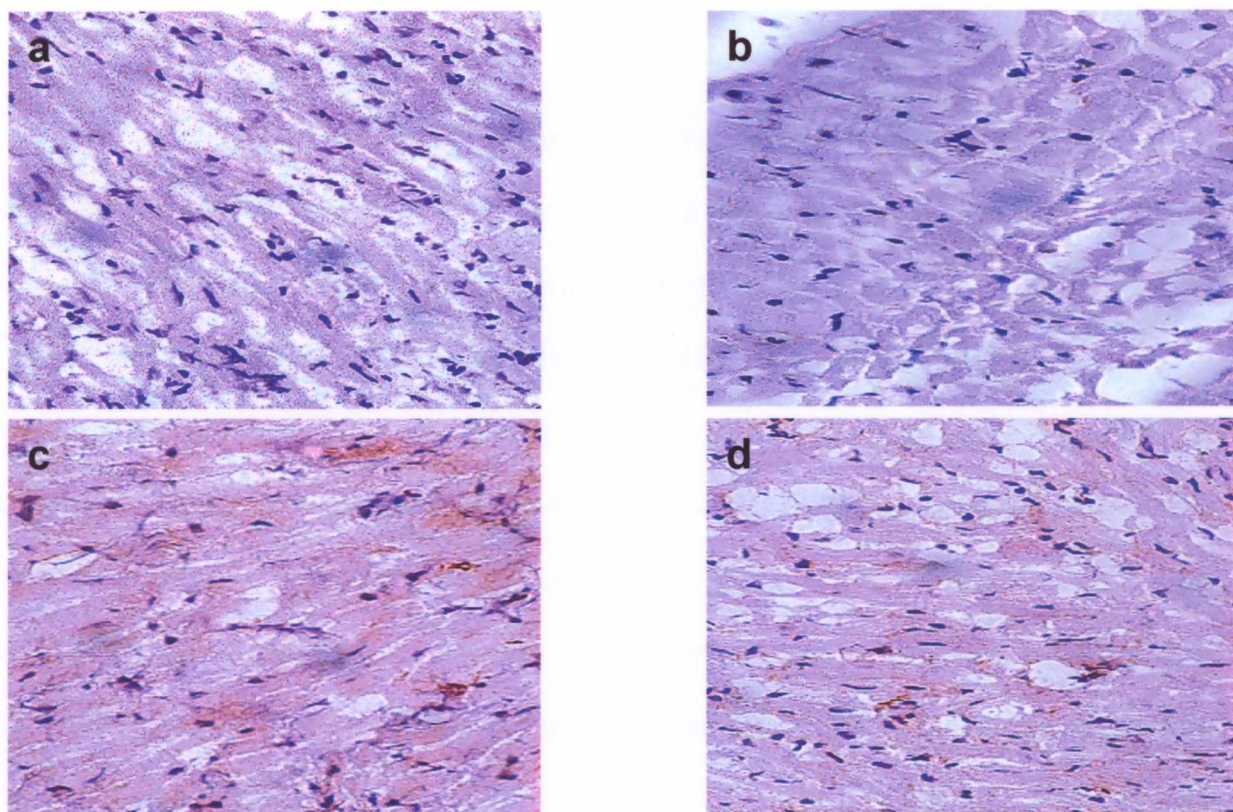


Figura 7 – Ligação de trans-sialidasas recombinantes a tecido cardíaco de camundongo, evidenciada pela técnica de imunoperoxidase.

Cortes de coração de camundongos nude não-infectados foram incubados com as seguintes soluções, antes de serem submetidos à reação de imunoperoxidase com um anticorpo monoclonal anti-TS, conforme descrito no Materiais e Métodos:

- (a) solução de Tris/HCl contendo o polipeptídeo correspondente ao domínio C-terminal da TS recombinante;
- (b) solução de Tris/HCl;
- (c) solução de Tris/HCl contendo o polipeptídeo correspondente a TS ativa recombinante e
- (d) solução de Tris/HCl contendo o polipeptídeo correspondente a TS inativa recombinante.

Aumento de 400x.

6 DISCUSSÃO

Um dos objetos de estudo deste trabalho foi o efeito da dessialilação do compartimento intravascular de camundongos na saída de *Trypanosoma cruzi* desse compartimento e em seu tropismo para outros tecidos. A dessialilação *in vivo* do compartimento intravascular de camundongos foi conseguida por injeção intravenosa de sialidase de *Vibrio cholerae*, confirmando resultados de Rosen e colaboradores (1989), que mostraram que endotélio de camundongos tratados dessa maneira perde a capacidade de adsorver lectinas específicas para ácido siálico. No presente trabalho, para garantir-se uma dessialilação completa, a sialidase utilizada teve sua atividade confirmada em um teste enzimo-fluorescente e foi utilizada em doses dez vezes maiores que a utilizada por Rosen e colaboradores (1989). Além disso, enquanto Rosen e colaboradores administraram uma só dose de sialidase, no presente trabalho foram administradas seis doses: 3, 2, 1 e 0 horas antes e 1 e 2 horas após a infecção intravenosa com os parasitos. Este tratamento levou à dessialilação do próprio tecido cardíaco, confirmada pela ausência de ligação de uma lectina siálico-específica a cortes do mesmo, evidenciando passagem *in vivo* da sialidase para o interstício.

Se o reconhecimento de ácido siálico desempenhasse um papel importante na migração de tripomastigotas, diferenças marcantes na taxa de saída dos parasitos do sangue de animais tratados e não-tratados com sialidase deveriam ser observadas. Contudo, os resultados aqui apresentados mostraram que esse não é o caso, já que a saída de *T. cruzi* de compartimentos intravasculares normais e dessialilados e o

tropismo do parasito para os diversos órgãos estudados dos animais dessialilados ou não-dessialilados foram semelhantes. O fato de que em alguns órgãos, e no sangue no tempo de 2 horas após a inoculação de tripomastigotas, o número de parasitos nos animais dessialilados era um pouco menor do que nos animais controle, poderia ser explicado pela maior susceptibilidade de parasitos dessialilados à lise pelo complemento, o que foi mostrado por Tomlinson e colaboradores (1992).

Do ponto de vista metodológico, é interessante observar a melhor hibridização da sonda de DNA satélite de *T. cruzi* da cepa Colombiana com o DNA de parasitos da mesma cepa, utilizados para infectar os camundongos dos experimentos, em relação à sonda para DNA satélite de *T. cruzi* da cepa Y. Isto indica diferenças nas seqüências de nucleotídeos dos DNAs satélites dessas duas cepas, que por sinal são cepas de diferentes biotemas (cepa Y, biotema 1; cepa Colombiana, biotema 3; ANDRADE, 1985; ANDRADE, 1999)

Existem evidências de que a TS, ou outra molécula da mesma família, liga-se a algumas linhagens celulares e a tecido cardíaco *in vivo* (ALCÂNTARA-NEVES, 1998). O fato de não mais do que 0,05% da atividade de TS ligar-se a células de mamíferos *in vitro*, e desta pequena ligação restringir-se à fração anfifílica do preparado de TS (ALCÂNTARA-NEVES, 1998), argumentava a favor de que moléculas enzimaticamente inativas pudessem ser responsáveis pela ligação a células *in vivo*.

No presente trabalho estudou-se a ligação das TSs recombinantes ativa e inativa a tecido cardíaco, pois trabalho anterior sobre a ligação da TS a tecido

cardíaco não discriminou se a molécula ligada ao tecido era enzimaticamente ativa ou inativa (ALCÂNTARA-NEVES, 1998). Comprovou-se dessa forma que, assim como a TS ativa, a TS inativa também liga-se a tecido cardíaco de camundongo.

Com o objetivo de investigar se a TS precisa da região N-terminal, que contém o sítio catalítico da enzima, para se ligar ao coração, utilizou-se também uma proteína recombinante que apresentava apenas o domínio C-terminal da TS. Verificou-se que não ocorreu ligação, indicando um envolvimento do domínio N-terminal na mesma, já que ambas as moléculas completas de TS ligaram-se ao tecido cardíaco. O sítio de ligação do anticorpo monoclonal utilizado encontra-se no domínio C-terminal (H. Uemura, comunicação pessoal, 2001), de maneira que, se tivesse havido a ligação da proteína apenas com esse domínio no coração, o anticorpo a teria revelado, como aconteceu com as ligações da TS ativa e da inativa. A ligação da TS ativa e inativa, portanto, provavelmente não ocorre através da porção C-terminal.

Em relação aos ligantes da TS no coração, foi demonstrado que a TS inativa só se liga a eritrócitos após eles terem sido dessialilados, isto é, terem resíduos de galactose expostos (CREMONA et al., 1999). A TS ativa, no entanto, não se liga a galactose, já que não ocorre aumento de sua ligação a células *in vitro* após dessialilação das mesmas (ALCÂNTARA-NEVES, 1998). É possível que as TSs ativa e inativa utilizem diferentes ligantes no coração, cuja naturezas precisam ser investigadas. Essas futuras investigações poderiam ter como objetivo o desenvolvimento de procedimentos para interferir com a ligação da TS ao coração e

estudar a sua importância no desenvolvimento da infecção por *T. cruzi* e/ou da patologia da doença de Chagas.

Independentemente da natureza da ligação da TS a tecido cardíaco, ela teoricamente pode desempenhar um papel importante na patogênese da doença de Chagas, visto que TS e/ou outro antígenos do *T. cruzi* poderiam sensibilizar células do hospedeiro de maneira a torná-las alvo de anticorpos parasito-específicos, como sugerido previamente (RIBEIRO DOS SANTOS, 1980), levando à lesão tecidual por ativação do complemento ou por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Deposição de complemento associada com lesão do músculo cardíaco foi descrita em camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (SILVA et al., 1985).

Estes resultados abrem perspectivas para novas pesquisas, como por exemplo investigar o papel da resposta imune anti-TS na infecção pelo *T. cruzi*, ou na patogenia da miocardite chagásica, pela indução de tolerância imunológica à TS, já que anticorpos anti-TS são encontrados em camundongos ou seres humanos infectados por *T. cruzi*. A imunização de camundongos com fragmentos de TS com atividade enzimática (RODRIGUES et al., 1999) mostrou que uma resposta imune anti-TS, diferente qualitativa ou quantitativamente da encontrada normalmente na infecção pelo *T. cruzi*, exerce uma ação de controle da infecção. Os resultados aqui relatados podem também motivar a realização de trabalhos visando estudar os sítios do domínio N-terminal da TS envolvidos em sua ligação à célula cardíaca, procurando interferir especificamente com essa ligação.

7 CONCLUSÕES

- O ácido siálico não é um ligante envolvido na saída do *T. cruzi* do compartimento intravascular, nem interfere significativamente com o tropismo do parasito para o pulmão, fígado, baço, rim, músculo esquelético e coração do hospedeiro vertebrado.
- A ligação da TS ao tecido cardíaco se dá através de sua região catalítica (domínio N-terminal), mas não depende da atividade enzimática, já que ambas moléculas de TS (ativa e inativa) ligam-se ao tecido.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFRANCHINO, J.L.; IBANEZ, C.F.; LUQUETTI, A.O; RASSI, A.; REYES, A.; MACINA, R.A.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U.; FRASCH, A.C.C Identification of *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **34**: 221-28, 1989.

AGUSTI, R.; COUTO, A.S; CAMPETELLA, O; FRASCH, A.C.C.; LEDERKREMER, R.M. Structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchor of the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote forms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **97**: 123-131, 1998.

ALCÂNTARA-NEVES, N.M.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C. Circulating trans-sialidase activity and trans-sialidase-inhibiting antibodies in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Parasitol. Res.**, **81**: 560-564, 1995.

ALCÂNTARA-NEVES, N.M. **O papel da trans-sialidase do *Trypanosoma cruzi* na interação parasito-hospedeiro.** 1998. 109f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ALMEIDA, I.C.; GAZZINELLI, R.; FERGUSON, M.A.J.; TRAVASSOS, L.R. *Trypanosoma cruzi*: potential functions of a complex structure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 173-175, 1999.

ANDRADE, S.G. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**: 39-46, 1985.

ANDRADE, S.G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 185-187, 1999.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30**: 27-35, 1997.

ANDRADE Z.A.; ANDRADE S.G. Patologia. In: BRENER, Z. & Andrade, Z. (eds.) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p 199-248.

ANDRADE Z.A.; ANDRADE S.G.; SADIGURSKY, M.; MAGUIRE, J.H. Experimental Chagas' disease in dogs. A pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. **Arch. Path. Lab. Med.**, **105**: 460, 1981.

ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 71-80, 1999.

ANDREWS, N.W.; HONG, K.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, **64**: 474-484, 1987.

ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Trends Cell Biol.**, **5**:133-136, 1995.

ARAÚJO-JORGE, T.C. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**: 441-462, 1989.

BUCHOVSKY, A.S.; CAMPETELLA, O.; RUSSOMANDO, G.; FRANCO, L.; ODDONE, R.; CANDIA, N.; LUQUETTI, A.; CAPPA, M.G.; LEGUIZAMON, M.S. Trans-sialidase inhibition assay, a highly sensitive and specific diagnostic test for Chagas' disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **8**: 187-189, 2001.

BURLEIGH, B.A.; ANDREWS, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Ann. Ver. Microbiol.**, **49**: 175-200, 1995.

BUSCAGLIA, C.A.; ALFONSO, J.; CAMPETELLA, O.; FRASCH, A.C. Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. **Blood**, **93**: 2025 – 2032, 1999.

BUSCHIAZZO, A.; TAVARES, G.A.; CAMPETELLA, O.; SPINELLI, S.; CREMONA, M.L.; PARIS, G.; AMAYA, M.F.; FRASCH, A.C.C.; ALZAR, P.M. Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. **Embo J.**, **19**: 16-24, 2000.

CARMO, M.S.; ARAYA, J.E.; RAMIREZ, M.I.; BOSCARDIN, S.; CANO, M.I.; BAIDA, R.P.; RUIZ, R.C.; SANTOS, M.R.; CHIURILLO, M.A.; RAMIREZ, J.L.; YOSHIDA, N.; SILVEIRA, J.F. Organization and expression of a multigene family encoding the surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes involved in the cell invasion. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 169-171, 1999.

CARRILLO, M.B.; GAO, W.; HERRERA, M.; ALROY, J.; MOORE, J.B.; BEVERLEY, S.M.; PEREIRA, M.A. Heterologous expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in *Leishmania major* enhances virulence. **Infect. Immun.**, **68**: 2728-2734, 2000.

CARVALHO, T.M.U.; SOUZA, W.; COIMBRA, E.S. Internalization of components of the host cell plasma membrane during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 143-147, 1999.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **3**: 219-75, 1911.

CHAGAS, C. Tripanosomíase americana: forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **8**: 37-60, 1916.

COLLI, W.; ALVES, M.J.M. Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 37-49, 1999.

CREMONA, M.L.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C.C.; CAMPETELLA, O. A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Gene**, **160**: 123-128, 1995.

CREMONA, M.L.; CAMPETELLA, O.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. **Glycobiology**, **9**: 581-7, 1999.

CUATRECASAS, P.; ILLIANO, G. Purification of neuraminidases from *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* and influenza virus by affinity chromatography. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **44**: 178-184, 1971.

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALEZ, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, **46**: 616-623, 1992.

EGIMA, C.M.; BRIONES, M.R.S.; FREITAS JR, L.H.G.; SCHENKMAN, R..PF.; UEMURA, H.; SCHENKMAN, S. Organization of trans-sialidase genes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **77**: 115-125, 1996.

FERRERO-GARCIA, M.A.; TROMBETTA, S.E.; SANCHEZ, D.O.; REGLERO, A.; FRASCH, A.C.C.; PARODI, A.J. The action of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on glycolipids and glycoproteins. **Eur. J. Biochem.** **213**: 765 – 771, 1993.

FRASCH, A.C. Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. **Parasitol.**, **108**: S37-S44, 1994.

FRASCH, A.C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, **16**: 282-286, 2000.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; COLLI, W.; ALVES, M.J.M. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **65**: 85-94, 1994.

HALL, B.F.; JOINER, K.A. Developmentally-regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. **J. Euk. Microbiol.**, **40**: 207-213, 1993.

HICKS, S.J.; THEODOROPOULOS, G.; CARRINGTON, S.D.; CORFIELD, A.P. The role of mucins in host-parasite interactions. Part I – Protozoan parasites. **Parasitol. Today**, **16**: 476-483, 2000.

KIERSZENBAUM, F.; STILES, B. Evidence supporting the existence of a host cell surface receptor for *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, **32**: 364-366, 1985.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol. Today**, **16**: 381-389, 2000.

LEE, S.; KIM, B. Trans-sialidase catalyzed sialylation of β -galactosyldisaccharide with an introduction of β -galactosidase. **Enzyme Microb. Technol.**, **28**: 161-167, 2001.

LEGUIZAMÓN, M.S.; CAMPETELLA, O.E.; CAPPÀ, M.G.; FRASCH, A.C.C. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. **Infect. Immun.**, **62**: 3441-3446, 1994.

LIMA, M.F.; VILLALTA, F. *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **33**: 159-170, 1989.

LOW, H.P.; TARLETON, R.L. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. **Acta Trop.**, **88**:137-149, 1997.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol. Today**, **14**: 119-123, 1998.

MEDINA-ACOSTA, E.; FRANCO, A.M.R.; JANSEN, A.M.; SAMPOL, M.; NEVES, N.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; GRIMALDI JR, G.; NUSSENZWEIG, V. Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable trypanosomatids. **Eur. J. Biochem.**, **225**: 333-339, 1994.

MEDINA-COSTA, E.; PAUL, S.; TOMLINSON, S.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C. Combined occurrence of trypanosomal sialidase / trans-sialidase activities and leishmanial metalloproteinase gene homologues in *Endotrypanum sp.* **Mol. Biochem. Parasitol.**, **64**: 273-282, 1994.

MILEI, J. Patologia. In: STORINO, R.; MILEI, J. **Enfermedad de Chagas**. Argentina: Mosby/Doyma, S.A., 1994. p.141-183.

MING, M.; CHUENCOVA, M.; ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M.E.A. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **59**: 243-52., 1993.

ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M.E.A. Entry of *Trypanosoma cruzi* into eukaryotic cells. **Infect. Agents Dis.**, **1**: 136-145, 1992.

OUAISSI, M.A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRAS-MASSE, H.; TARTAR, A. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. **Science**, **234**: 603-607, 1986a.

OUAISSI, M.A.; CORNETTE, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **19**: 201-211, 1986b.

PARODI, A.J.; POLLEVICK, G.D.; MAUTNER, M.; BUSCHIAZZO, A.; SANCHEZ, D.O.; FRASCH, A.C. Identification of the gene(s) coding for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*. **Embo J.**, **11**: 1705-1710, 1992.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; COSTA, F.; RIBEIRÃO, M.; SOARES, I.S.; ARENA, F.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. **Parasite Immunol.**, **21**: 103-110, 1999.

PEREIRA, M.E.A.; MEJIA, J.S.; ORTEGA-BARRIA, E.; MATZILEVICH, D.; PRIOLI, R.P. The *Trypanosoma cruzi* neuraminidase contains sequences similar to bacterial neuraminidase, YWTD repeats of low density lipoprotein receptor, and type III modules of fibronectin. **J. Exp. Med.**, **174**: 179-91, 1991.

PILATTE, Y.; BIGNON, J.; LAMBRÉ, C.R. Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. **Glycobiology**, **3**: 201-217, 1993.

PIRAS, M.M.; HENRÍQUEZ, D.; PIRAS, R. The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the *in vitro* penetration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote into fibroblastic cells. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **22**: 135-143, 1987.

POLLEVICK, G.D.; SANCHEZ, D.O.; CAMPETELLA, O.; TROMBETTA, S.; SOUSA, M.; HENRIKSSON, J.; HELLMAN, U.; PETTERSSON, U.; CAZZULO, J.J.; FRASCH, A.C. Members of the SAPA/trans-sialidase protein family have identical N-terminal sequences and a putative signal peptide. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **59**: 171-174, 1993.

PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; TOMLINSON, S.; VANDEKERCKHOVE, F.; BIENEN, E.J.; CLARKSON, A.B.; JIANG, M.; HART, G.W.; NUSSENZWEIG, V. Characterization of a novel trans-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor. **J. Exp. Med.**, **177**: 465-474, 1993.

RAMIREZ, M.I.; RUIZ, R.C.; ARAYA, J.E.; SILVEIRA, J.F.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote in host cell invasion. **Infect. Immun.**, **61**: 3636-3641, 1993.

RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; EICHINGER, D.; RODRIGUES, M.M.; SCHENKMAN, S. Temperature differences for trans-glycosylation and hydrolysis reaction reveal na acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, **7**: 1237-1246, 1997.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. **Parasite Immunol.**, **2**: 1-10, 1980.

RODRIGUES, M.; RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.; RENIA, L.; COSTA, F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect. Immun.**, **67**: 3855-3863, 1999.

ROSEN, S.D.; CHI, S.; TRUE, D.D.; SINGER, M.S.; YEDNOCK, T.A. Intravenously injected sialidase inactivates attachment sites for lymphocytes on high endothelial venules. **J. Immunol.**, **142**: 1895-902, 1989.

ROSSI, M.A.; GONÇALVES, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice: the potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **Am. J. Pathol.**, **114**: 209-216, 1984.

ROTH, J. Cellular sialoglycoconjugates: a histochemical perspective. **Histochem. J.**, **25**: 687 –710, 1993.

SCHAUER, R.; MÜHLPFORDT, G.R.H.; ANDRADE, A.F.B.; PEREIRA, M.E.A. The occurrence of N-acetyl- and N-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, **364**: 1053-1057, 1983.

SCHENKMAN, R.P.F.; VAN DEKERCKHOVE, F.; SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, **61**: 898-902, 1993.

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Exp. Parasitol.**, **72**: 1-10, 1991a.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M.S.; HART, G.W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell**, **65**: 1117-25, 1991b.

SCHENKMAN, S.; KUROSAKI, T.; RAVETCH, J.; NUSSENZWEIG, V. Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of non-phagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, **175**: 1635-41, 1992a.

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R.A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **J. Cell Science**, **101**: 895-905, 1992b.

SCHENKMAN, S.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzyme. **J. Exp. Med.**, **175**: 567-75, 1992c.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M.A.J.; HEISE, N.; CARDOSO-DE-ALMEIDA, M.L.; MORTARA, R.; YOSHIDA, N. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol**, **59**: 293-304, 1993.

SCHENKMAN, S.; CHAVES, L.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; EICHINGER, D. A proteolytic fragment of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase lacking the carboxyl-terminal domain is active, monomeric, and generates antibodies that inhibit enzymatic activity. **J. Biochem. Chem.**, **269**: 7970-75, 1994a.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Ann. Rev. Microbiol.**, **48**: 499-523, 1994b.

SCUDDER, P.; DOOM, J.P.; CHUENKOVA, M.; MANGER, I.D.; PEREIRA, M.E.A. Enzymatic characterization of β -D-galactoside α 2,3-trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, **13**: 9886-9891, 1993.

SILVA, J.C.; PIRMEZ, C.; MORGADO, M.G.; GALVÃO CASTRO, B. The immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the acute infection. **Parasite Immunol.**, **7**: 457-466, 1985.

SMITH, L.E.; EICHINGER, D. Directed mutagenesis of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enzyme identifies two domains involved in its sialyltransferase activity. **Glycobiology**, **7**: 445-451, 1997.

SOARES, M.B.P.S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Immunopathology of cardiomyopathy in the experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 257-262, 1999.

SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 17-36, 1999.

TOMLINSON, S.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; VANDEKERCKHOVE, F.; NUSSENZWEIG, V. Resialylation of sialidase-treated sheep and human erythrocytes by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: restoration of complement resistance of desialylated sheep erythrocytes. **Glycobiology**, **2**: 549-551, 1992.

UEMURA, H.; SCHENKMAN, S.; NUSSENZWEIG, V.; EICHINGER, D. Only some members of a gene family in *Trypanosoma cruzi* encode proteins that express both trans-sialidase and neuraminidase activities. **EMBO J.**, **11**: 3837-44, 1992.

VARKI, A. Diversity in the sialic acids. **Glycobiology**, **2**: 25-40, 1992.

VARKI, A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. **FASEB J**: 248-255, 1997.

VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M.N.L. Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma*-host cell interaction: possible biological model – a Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **89**: 69-79, 1994.

WHO Control Of Chagas' Disease – Report a WHO Exper Comite. **WHO Technical Report Series, 811**: 1-95, 1991.

WILSON, J.C.; KIEFEL, M.J.; ALBOUZ-ABO, S.; von ITZSTEIN, M. Preliminary ^1H NMR investigation of sialic acid transfer by the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorgan. Med. Chem. Lett.**, **10**: 2791-2794, 2000.