

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**PAPEL DO EIXO ÁCIDO SIÁLICO-SIGLECS NA INFECÇÃO
DE NEUTRÓFILOS POR *Trypanosoma cruzi***

MATHEUS DA ROSA VALENTE

MATHEUS DA ROSA VALENTE

**PAPEL DO EIXO ÁCIDO SIÁLICO-SIGLECS NA INFECÇÃO
DE NEUTRÓFILOS POR *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia,
como requisito parcial para obtenção
do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Spiller
Co-orientadora: Dr^a. Milene Höehr de Moraes

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Rosa Valente, Matheus

Papel do eixo ácido siálico-siglecs na infecção
de neutrófilos por *Trypanosoma cruzi* / Matheus da
Rosa Valente ; orientador, Fernando Spiller,
coorientadora, Milene Höehr de Moraes, 2018.

68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

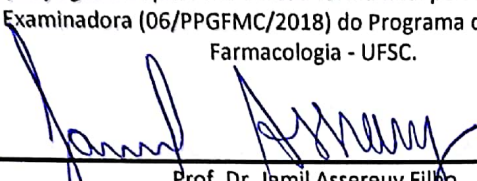
1. Farmacologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Ácido
Siálico. 4. Neutrófilos. 5. Siglecs. I. Spiller,
Fernando. II. Höehr de Moraes, Milene. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

**"O papel do eixo Ácido Siálico-Siglecs na Infecção de neutrófilos por
Trypanosoma cruzi"**

Por


Matheus da Rosa Valente

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (06/PPGPMC/2018) do Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia - UFSC.

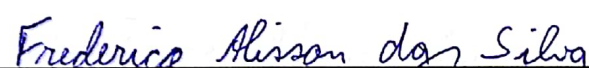


Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia


Banca examinadora:




Dr. Fernando Spiller (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr.(a) Frederico Alisson da Silva (Universidade Federal do Rio de Janeiro)



Dr. Edmundo Carlos Grisard (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Afeuzanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 11 de maio de 2018.

*Dedico aos meus queridos pais
Francisco Valente e Bianca Valente
pelo amor incondicional e terem sempre
me apoiado nas diversas etapas da vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Fernando Spiller e Dr^a Milene Höehr de Moraes pela orientação e coorientação, juntamente aos Professores do Departamento de Farmacologia e MIP Dr. Daniel Mansur, Dr. André Báfica, Dr^a. Patrícia Stocco, Dr. Mario Steindel e Dr. Edmundo Grisard pelos conselhos, discussões científicas e incentivo que permitiram a realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer a toda minha família pelo apoio, amor e compreensão à minha ausência durante o período da realização da pós-graduação além do incentivo que sempre me deram aos estudos.

Não poderia deixar de agradecer a todos meus colegas de laboratório do LiDI (Filho, Murilo, Adara, Mendes, Edgar, Zamira, Greicy, Lucas, Chico e aos demais) Laboratório de Protozoologia (Carime, Abadio, Adriana, Tati, Lari e Nati) e Laboratório de Farmacologia Experimental (Débora, Bauru, Mallone, Sérgio e Marcella) pelos conselhos, paciência, aprendizado, a amizade e os momentos de descontração. Um agradecimento em especial à Flávia Cardoso, Cristina Lorenzini e Jonathan Coimbra, pela amizade, carinho, “puxadas de orelha”, valiosas convivências e por terem me ensinado o que é ser uma pessoa mais humana.

Aos demais amigos e colegas do PPG Farmacologia e ao corpo técnico do LAMEB.

A todos os meus amigos fora da pós-graduação, em especial ao Marcelo, Lucas e Bruno, pelas reuniões nos finais de semana as quais eram repletas de risadas, violão e jogos. Ao Roger Gondran e Danilla das Neves que tive o prazer de conhecê-los durante minha internação hospitalar na fase final da elaboração da dissertação. Me mostraram de maneira muito simples que a vida é valiosa e que precisa ser valorizada e aproveitada. Me mostraram que jamais devo perder o bom humor e que devo manter sempre as pessoas que amamos à nossa volta.

Ao meu companheiro, Márcio que sempre me deu forças e apoiou durante a realização da pós-graduação. Pelas conversas, momentos de lazer, o cuidado durante meu período pós-operatório e a compreensão pela ausência enquanto estive envolvido com o mestrado.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite ¹-convite.

Ao CNPq, CAPES e UFSC pelo incentivo financeiro.

A todos, muito obrigado.

*“A verdadeira motivação vem de
Realização, desenvolvimento pessoal,
Satisfação no trabalho e reconhecimento.”
(Frederick Herzberg)*

RESUMO

O agente etiológico causador da doença Doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi*. Um dos mecanismos conhecidos de evasão do sistema imune que algumas cepas de *T. cruzi* utilizam é através da enzima *Trans-Sialidase* (TS), que transfere o ácido siálico presente na superfície das células do hospedeiro para incorporar na sua própria estrutura. Os ácidos siálicos são um importante componente no reconhecimento, adesão e sinalização celular. Os receptores Siglec reconhecem carboidratos do tipo ácido siálico através de domínios extracelulares e são encontrados em sua maioria em células do sistema imune como os neutrófilos. A hipótese do trabalho é que o *T. cruzi* (cepa Tulahuén) infecta neutrófilos humanos através do reconhecimento de receptores Siglec-5 e/ou -9. Os resultados mostraram que os neutrófilos humanos isolados foram infectados pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi* tanto no MOI 1 ($9,6 \pm 1$ %) quanto no MOI 5 (25 ± 1 %) e que o pré-tratamento com os anticorpos neutralizantes reduziu a porcentagem de células infectadas tanto com anti-hSiglec-5/14 ($47,75\% \pm 4,36$, $p < 0,01$) como anti-hSiglec-9 ($43\% \pm 6,7$, $p < 0,01$). Além disso, foi observado que Siglec-9 (4,84%), mas não Siglec-5 (0,60%) se liga na superfície do parasito. Os resultados de expressão mostraram uma diminuição dos receptores de Siglec-5 (1974 ± 1137) ($p = 0,776$) e um aumento na expressão dos receptores de Siglec-9 nos neutrófilos após a infecção (1517 ± 395) ($p = 0,185$). Concluindo, os neutrófilos humanos isolados são infectados por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén) *in vitro* por um possível mecanismo dependente do eixo ácido siálico-Siglec.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Tulahuén, Siglec-5, Siglec-9, Neutrófilo, Ácido Siálico.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas's disease. The use of the Transialidase (TS) enzyme is one of the known mechanisms used to evade immune system in vertebrates. This enzyme cleaves and transfer sialic acid from the host cell to its own surface. Sialic acids are crucial in vertebrate's cell-to-cell communication, adhesion and cellular signaling. Siglec family receptors play an important role in this context; they recognize sialic acid on their extracellular domain to activate endocytosis and activate inhibitory intracellular pathways. These receptors are found mainly in immune cells' surface such as neutrophils. The hypothesis is that *T. cruzi* (Tulahuén strain) infects human neutrophils through binding on Siglec-5 and/or Siglec-9 receptors. Our results showed that isolated human neutrophils are infected by *T. cruzi* (Tulahuén strain) in both MOI 1 ($9,6 \pm 1$ %) and MOI 5 (25 ± 1 %) and the pre-treatment with neutralizing antibodies reduced the infection in both anti-hSiglec-5/14 ($47,75\% \pm 4,36$, $p < 0,01$) and anti-hSiglec-9 ($43\% \pm 6,7$, $p < 0,01$). Additionally, we observed that Siglec-9 (4,84%) but not Siglec-5 (0,60%) bind on Tulahuén strain's surface. The expression of Siglec-5 decreased (1974 ± 1137) ($p = 0,776$) and Siglec-9 increased (1517 ± 395) ($p = 0,185$) in human neutrophils after infection. To conclude, tripomastigotas forms of Tulahuén strain infect isolated human neutrophils *in vitro* and this mechanism is suggested to be dependent of sialic acid-Siglec axis.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Tulahuén, Siglec-5, Siglec-9, Neutrophil, Sialic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> sp.....	26
Figura 3. Estrutura dos ácidos siálicos e exemplos.....	28
Figura 4. Rota de síntese de ácido siálico em células eucariotas.....	29
Figura 5. Infecção com formas tripomastigotas da cepa Tulahuén em neutrófilos humanos isolados em gradiente de Percoll®.....	44
Figura 6. Ligantes de Siglec-9 e Siglec-5 na superfície da cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
Figura 7. Infecção de neutrófilos humanos isolados por gradiente de Percoll® pré-tratados com anticorpos neutralizantes dos receptores de Siglec-5 e Siglec-9 e proteína de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida(AGP).....	46
Figura 8. Modelo de infecção <i>in vivo</i> com cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongos.....	47
Figura 9. Avaliação dos ligantes de Siglec-5 e Siglec-9 e ligação de lectinas SNA e MAA na superfície da cepa re-isolada de Tulahuén.....	48
Figura 10. Interação de neutrófilos humanos isolados com formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Tulahuén) marcadas com Syto24®.....	49
Figura 11. Expressão de receptores de Siglec e ligação de lectinas em neutrófilos infectados ou não por <i>T. cruzi</i> cepa Tulahuén.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos e classificação das cepas de <i>Trypanosoma. cruzi</i> e suas respectivas DTU.....	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AGP – Proteína de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida

APC - Alofocianina

CMAS - CMP-NeuAc sintetase

CTP - citidina 5'-trifosfato

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FSC – *Forward Scatter*

GNE - 2-epimerase/ManNAc-6-kinase

GPI – Glicofosfatidilinositol

HBSS - Solução Salina Balanceada de Hanks, do inglês, *Hanks Balanced Salt Solution*

ITAM – *immunereceptor tyrosine-based activation motifs*

ITIM – *immunereceptor tyrosine-based inhibitory motifs*

MAA – *Maackia amuriensis*

ManNAc - N-acetil-D-manosamina

ManNAc-6-P - N-acetil-D-manose-6-fosfato

MFI – Mediana de Intensidade de Fluorescência

MOI – Multiplicidade de Infecção, do inglês, *Multiplicity of Infection*

NANP - Neu5Ac-9-P fosfatase

NANS - NeuAc-9-P sintetase

NET – do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*

Neu5,9Ac2 - Ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico

Neu5Ac - Ácido N-acetilneuramínico

Neu5Ac-9-P - Ácido acetilneuramínico-9-fosfato

Neu5Gc - Ácido N-gliconeuramínico

PBS – Tampão Fosfato, do Inglês, *Phosphate Saline Buffer*

PE – Ficoeritrina

PEP – fosfoenolpiruvato

ROS – do inglês, *Reactive Oxygen Species*

RPMI – Meio de cultura celular, do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*.

SHP-1 – do inglês, *SH2-containing phosphatase 1*

SHP-2 – do inglês, *SH2-containing phosphatase 2*

Siglec – do inglês, *Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*

SNA – *Sambucus nigra*

SSC – *Side Scatter*

ST - sialiltransferase

TS – Trans-sialidase

UDPGlcNAc - Uridina 5'-difosfato-N-acetil-D-glucosamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.2 Ácido Siálico.....	27
1.3 Neutrófilos	31
1.4 Siglecs (<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins</i>)	32
2. HIPÓTESE.....	35
3. OBJETIVOS	35
3.1. Geral.....	35
3.2. Específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Doadores saudáveis.....	36
4.2 Separação de neutrófilos humanos por gradiente de Percoll®....	36
4.3 Obtenção das formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Tulahuén	37
4.4 Avaliação da presença de ligantes de Siglec-5 e Siglec-9 na superfície do <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
4.5 Ensaio <i>in vitro</i> de infecção de neutrófilos humanos com <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
4.6 Avaliação da expressão dos receptores Siglec-5 e Siglec-9 em neutrófilos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
4.7 Marcação de formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> com sonda fluorescente Syto24®	38
4.8 Marcação de Lectinas biotiniladas SNA e MAA com Estreptavidina PE.....	39
4.9 Ensaio de infecção de neutrófilos humanos por forn tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> marcadas com Syto24®	39

4.10 Animais.....	39
4.11 Diretrizes ARRIVE e pontos finais humanitários.....	40
4.12 Infecção de camundongos BALB/C com formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Tulahuén).....	41
4.13 Avaliação da curva de parasitemia	41
4.14 Contagem de leucócitos totais de camundongos infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
4.15 Análise Estatística.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Infecção de neutrófilos humanos com formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
5.2 Avaliação da presença dos ligantes de Siglec-9 e Siglec-5 na superfície da cepa Tulahuén de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
5.3 Avaliação da taxa de infecção após pré-tratamento com anticorpos neutralizantes dos receptores de Siglec-5 e Siglec-9 e proteína de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida (AGP).....	45
5.4 Ensaio de infecção <i>in vivo</i> com <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongos BALB/C: Avaliação de peso, parasitemia, contagem de leucócitos totais e número absoluto de neutrófilos.	46
5.5 Avaliação dos ligantes de Siglec-5 e Siglec-9 e ligação de lectinas aos ácidos siálicos presente na superfície do <i>T. cruzi</i> (Re-isolada) ..	47
5.6 Interação de neutrófilos humanos isolados com formas tripomastigotas de Tulahuén marcadas com Syto24® por citometria de fluxo	49
5.7 Expressão de receptores de Siglec-5 e Siglec-9 e ligação de lectinas <i>Sambucus nigra</i> (SNA) e <i>Maackia amuriensis</i> (MAA) na superfície de neutrófilos humanos infectados ou não por <i>Trypanosoma cruzi</i>
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO.....	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas (DC) é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma doença negligenciada e acomete cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2017), sendo estas 3 milhões somente no Brasil (DIAS, 2006). Além do Brasil, as regiões mais afetadas pela doença são países da América do Latina como Colômbia, Venezuela, México, Chile e Argentina (**Figura 1**) levando no total cerca de 10.000 mortes/ano (WHO, 2017).

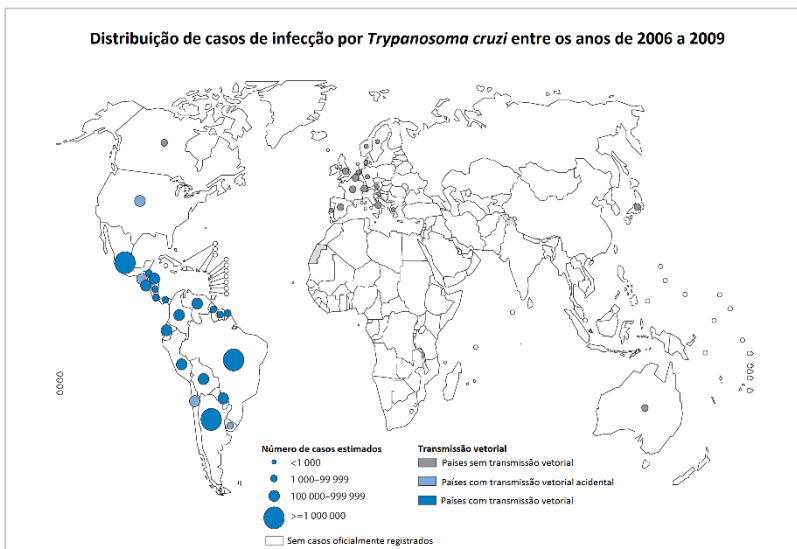


Figura 1. Casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de: WHO, 2010.

O agente etiológico causador dessa doença é o *Trypanosoma cruzi* que inicia seu ciclo biológico quando o Triatomíneo infectado entra em contato com o hospedeiro humano. No momento em que o inseto se alimenta de sangue do hospedeiro ele deposita fezes que podem estar contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* (formas infectivas). A autoinfecção ocorre quando o hospedeiro se coça após a picada do inseto e essas formas metacíclicas acabam entrando no hospedeiro através das mucosas e chegam na

corrente circulatória onde o parasito pode infectar células nucleadas, como monócitos. No citoplasma da célula infectada o parasito se diferencia para forma amastigota (replicativa) que por sua vez se multiplicam por divisão binária. Após replicação, ainda dentro da célula, as formas amastigotas se diferenciam novamente para tripomastigotas e acabam rompendo a célula do hospedeiro liberando maior conteúdo de formas infectivas na corrente circulatória. Esse processo favorece a sobrevivência do parasito e a manutenção do ciclo (BRENER et al., 2000) (**Figura 2**).

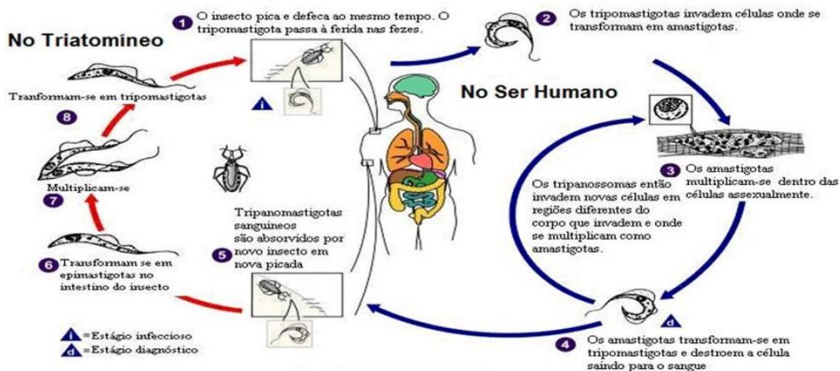


Figura 2. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de: dpd.cdc.gov

A doença de Chagas se apresenta em duas fases. A primeira delas é a fase inicial aguda que dura cerca de dois meses após a infecção. Durante essa fase um grande número de parasitos está presente na corrente circulatória do hospedeiro humano. Na maioria dos casos, esta fase se apresenta assintomática ou branda e inespecífica. Cerca de 50% dos casos, na área da picada do inseto triatomíneo pode apresentar alguns sinais característicos como o “chagoma”, que facilita o diagnóstico médico precoce. Quando sintomáticos na fase aguda os sinais mais comuns são febre, dores de cabeça, dor muscular, dor abdominal e dores ao respirar. Durante a fase crônica, ocorre um tropismo dos parasitos para órgãos como coração e trato gastrointestinal. Cerca de 30% dos pacientes crônicos possuem complicações cardíacas e 10% de problemas intestinais como megacólon, megaesôfago e problemas neurológicos. Ao passar dos anos, o paciente infectado

crônico pode falecer devido às arritmias e falência do músculo cardíaco (MARIN-NETO et al., 1999; BRENER et al., 2000; WHO, 2017;)

O tratamento disponível atualmente consiste em duas drogas utilizadas na fase aguda. O benzonidazol e nifurtimox são o tratamento de escolha para infecções na fase aguda da doença. Se tomados logo após a infecção, as chances de eliminação do parasito chegam a quase 100% e essa eficácia diminui ao passo em que a parasitemia aumenta. Apesar dos medicamentos surtirem um significativo efeito no tratamento da doença na fase aguda, cerca de 40% dos pacientes ainda precisam lidar com os efeitos colaterais decorrentes do tratamento (BERN et al 2007; WHO, 2017).

Devido à grande variabilidade biológica, bioquímica e genética de diversas cepas de *T. cruzi* surgiu a necessidade de realizar uma classificação de acordo com estas características. A primeira classificação realizada em um encontro realizado em 1999 na Fiocruz (Rio de Janeiro) foi determinada que as cepas de *T. cruzi* fossem classificadas em dois grandes grupos: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. Mais recentemente, em Búzios, no ano de 2009, a classificação das cepas entrou em um novo consenso e passaram a ser classificadas de acordo com as DTU (do inglês, *Discrete Typing Units*) sendo seis DTU diferentes de I a VI (**Tabela 1**) (ZINGALES, B 2009).

Tabela 1. Exemplos e classificação das cepas de *T. cruzi* e suas respectivas DTUs. Adaptada de: Zingales, et al., 2009.

Cepa	DTU	País
Colombiana	<i>T. cruzi</i> I	Colômbia
Y	<i>T. cruzi</i> II	São Paulo/Brasil
M6241 c16	<i>T. cruzi</i> III	Pará/Brasil
4167	<i>T. cruzi</i> IV	Amazonas/Brasil
SO3 c15	<i>T. cruzi</i> V	Bolívia
Tulahuén	<i>T. cruzi</i> VI	Chile

1.2 Ácido Siálico

Os ácidos siálicos são categoricamente classificados como carboidratos, porém possuem sua estrutura principal diferente dos demais açúcares deste grupo. Ao invés de possuir um anel Polioli (-

CHOH-]n) comum de monossacarídeos como glicose ou frutose, os ácidos siálicos podem apresentar moléculas substituintes como N-glicanos, O-glicanos e proteínas ancoradas em glicofosfatidilinositol (GPI). Outra diferença que estes carboidratos têm dos demais açúcares é que eles não são fonte primária de energia para a célula, mas atuam como um importante componente no reconhecimento, adesão e sinalização celular (VARKI, A. 2009).

A estrutura comum de todos os ácidos siálicos se baseia em uma cadeia cíclica de nove carbonos sendo C1 um ácido carboxílico que confere uma carga negativa intrínseca na molécula (**Figura 3**). Os ácidos siálicos mais comuns encontrados são o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac, NeuNAc ou NANA), ácido N-gliconeuramínico (Neu5Gc ou Neu5Glc) e ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico (Neu5,9Ac2) (VARKI, A., 2009). As estruturas dos diferentes ácidos siálicos podem ser formadas através de modificações nos carbonos C4, C7, C8 e C9 e no grupamento amina localizado no C5. Além disso, os grupamentos hidroxilas dos carbonos C4, C7, C8 e C9 podem ser acetilados, fosforilados, sulfonados ou metilados (VARKI, A. 2009).

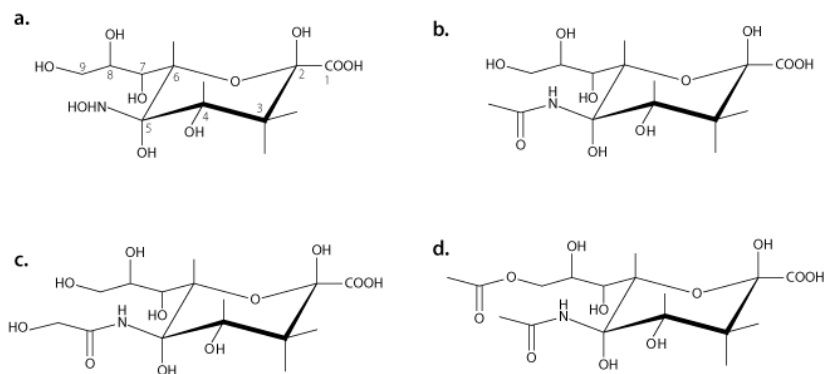


Figura 3. Estrutura dos ácidos siálicos e exemplos. (a) ácido neuramínico, (b) ácido N-acetilneuramínico - Neu5Ac, (c) ácido N-gliconeuramínico - Neu5Gc e (d) ácido N-acetil-9-O-acetilneuramínico - Neu5,9Ac₂. Adaptado de: Freire-de-Lima, 2015.

A síntese de ácido siálico em organismos vertebrados ocorre no interior da célula e possui cinco etapas. Inicialmente, o primeiro substrato da rota Uridina 5'-difosfato-N-acetil-D-glucosamina (UDPGlcNAc) é convertido pela enzima de atividade dupla UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc-6-kinase (GNE) em N-acetil-D-manosamina (ManNAc). Em seguida, a kinase da enzima GNE fosforila o açúcar produzindo a molécula N-acetil-D-manose-6-fosfato (ManNAc-6-P) para que em seguida essa molécula seja convertida para o precursor de ácido siálico ácido acetilneuramínico-9-fosfato (Neu5Ac-9-P) através de uma reação de condensação de fosfoenolpiruvato (PEP) e ManNAc-6-P pela enzima NeuAc-9-P sintetase (NANS). O precursor Neu5Ac-9-P é então defosforilado pela enzima Neu5Ac-9-P fosfatase (NANP) para produzir o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) (**Figura 4A**).

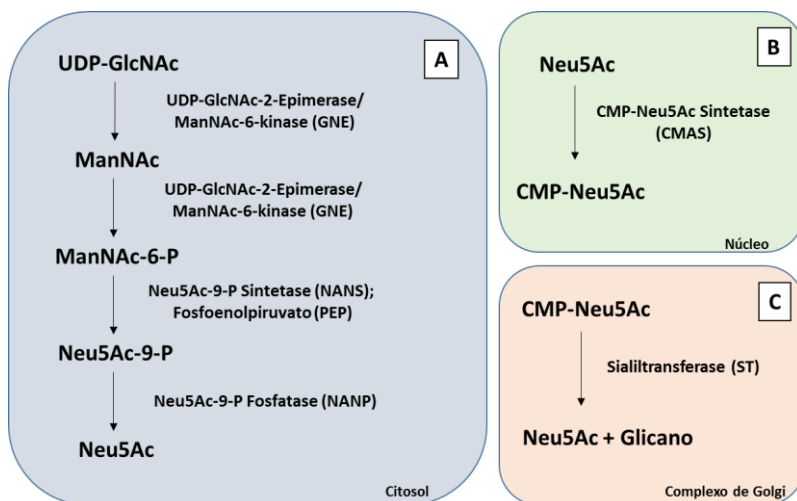


Figura 4. Rota de síntese de ácido siálico em células eucariotas. Formação de Neu5Ac no citosol (A), síntese de substrato doador no núcleo (B) e ligação de compostos glicanos ao Neu5Ac no complexo de Golgi (C).

Após a etapa de síntese de Neu5Ac, um substrato é adicionado na estrutura para que uma molécula de oligossacarídeo seja incorporada na no ácido siálico. A molécula de Neu5Ac é transportada do citosol para o núcleo da célula eucariota onde é adicionado uma molécula de

citidina 5'-monofosfato (CMP) pela enzima CMP-NeuAc sintetase (CMAS) formando a molécula CMP-Neu5Ac (**Figura 4B**). Após este processo, CMP-Neu5Ac é transportado para o complexo de Golgi para que seja incorporado a oligossacarídeos por enzimas sialiltransferases (ST). A ação da ST resulta em ligações específicas de glicosídeos ($\alpha 2 \rightarrow 3$, $\alpha 2 \rightarrow 6$, ou $\alpha 2 \rightarrow 8$) em aceptores monossacarídeos localizados nos ácidos siálicos (**Figura 4C**) (VARKI, A. 2009).

Os ácidos siálicos desempenham um papel biológico importante em mamíferos. Já foi demonstrado que a deleção do gene que codifica a enzima UDP-N-GlcNAc 2-epimerase em camungongos é incompatível com a vida fazendo com que não ocorra desenvolvimento na fase embrionária (SCHWARZKOPF, M., et al. 2002). Além disso, foi demonstrado que a suplementação com ácido siálico na dieta é necessária para desenvolvimento neuronal em mamíferos (WANG, B., 2009). Em nível de sistema imune inato em vertebrados, o reconhecimento dos ácidos siálicos da própria célula pelos receptores do tipo Siglec em sua superfície (ligações “cis”) são descritos como mecanismos de reconhecimento de células próprias e impedem o ataque de macrófagos ou outras células do sistema imune (VARKI, A & ANGATA, T., 2006). A perda do ácido siálico terminal pela ação de enzimas sialidases expõem os receptores Siglec que ficam disponíveis para serem alvo de ligação de ácidos siálicos oriundos de uma outra célula ou de outros patógenos (ligações “trans”).

Existem diversos patógenos como vírus, bactérias e protozoários que utilizam o ácido siálico como estratégia para infectar células e escapar do sistema imunológico. Algumas bactérias como *Streptococcus agalactiae* e *Neisseria meningitidis*, são capazes de sintetizar ácido N-acetilneuramínico como mecanismo de evasão do sistema imunológico mimetizando compostos glicanos sialilados. (MIZANUR, R.M. & POHL, N.L., 2008). Além disso, parasitos como o *Plasmodium falciparum* utilizam hemaglutininas que se ligam ao Neu5Ac para infectar eritrócitos humanos (GAUR et al., 2007). Adicionalmente, um dos mecanismos conhecidos de evasão do sistema imune que a maioria das cepas de *T. cruzi* utiliza é uma enzima chamada de *trans*-Sialidase (TS) (BURLEIGH & WOOLSEY, 2002). Essa enzima transfere o ácido siálico presente na superfície das células do hospedeiro e incorpora nas mucinas presentes em sua superfície na conformação $\alpha 2,3$ (LEDERKREMER & AUGUSTI, 2009). Estes eventos podem facilitar a aderência e invasão de formas tripomastigotas nas células hospedeiras (SCHENKMAN et al., 1993) e também proteger

os parasitos da ação de anticorpos líticos devido à forte carga negativa na superfície devido a presença do ácido siálico (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000).

1.3 Neutrófilos

Os neutrófilos são células do sistema imunológico e geralmente são a primeira linha de defesa ao combate de organismos patogênicos no hospedeiro. São células sanguíneas brancas mais abundantes em humanos (50 - 70%), participam da reposta inflamatória aguda e possuem uma resposta eficaz na eliminação de patógenos e quaisquer outros debris celulares no local (NATHAN, 2006; AMULIC et al., 2012; MAYADAS et al., 2013).

Os neutrófilos humanos são células de vida relativamente curta, tendo aproximadamente tempo de vida entre 8 – 12h em condições fisiológicas normais (SHI, 2001), podendo chegar a 24h horas em infecções bacterianas *in vitro* (KINKEAD, L.C. et al., 2018). Os granulócitos são produzidos na medula óssea constantemente e quando necessários são facilmente recrutados para a corrente circulatória (SADIK, KIM & LUSTER, 2011). Os principais reservatórios desta célula são, além da medula óssea, o fígado, baço e, em maior quantidade, nos pulmões (SIBILLE e MARCHANDISE, 1993).

Um dos principais mecanismos de defesa frente a patógenos dessa célula é a fagocitose. Este processo consiste no reconhecimento dos patógenos opsonizados pelo sistema complemento pelos receptores Fc e os engloba para seu interior na forma de vesículas onde ocorre a eliminação do patógeno por liberação de lisoenzimas e espécies reativas de oxigênio (FIERRO et al., 1999; BROWN et al., 2006), ou ainda através do mecanismo de liberação de proteínas bactericidas, contidas em grânulos citoplasmáticos (SEGAL, 2005). Outro mecanismo de defesa dos neutrófilos recentemente conhecido é a liberação de seu conteúdo nucleico em forma de fibras ou redes denominadas NET (do inglês, *neutrophil extracellular traps*). As NET são eficazes na eliminação dos patógenos por imobilização, permitindo que sejam fagocitados por outras células e contribuindo, portanto, no controle da infecção (BRINKMANN et al., 2004; PHILLIPSON & KUBES, 2011; NAUSEEF & BORREGAARD, 2014).

Os neutrófilos desempenham um papel importante na resposta contra infecções ao *T. cruzi* em organismos vertebrados. Já foi bem demonstrado que formas epimastigotas de *T. cruzi* cepas Y e Tulahuén são susceptíveis à lise e fagocitose de neutrófilos isolados de murinos e

de humanos (LÓPEZ, A.F. et al., 1978; SANDERSON & SOUZA, 1979; RIMOLDI, M.T. et al., 1981). Além disso, também já foi demonstrado que outras espécies de *Trypanosoma* spp. como o *Trypanosoma dionisii* são reconhecidos e fagocitados por neutrófilos e monócitos humanos (THORNE et al., 1979). Alguns anos após, foi relatado por Cardoni e colaboradores o envolvimento de respostas metabólicas de polimorfonucleares isolados de humanos, como espécies reativas de oxigênio (ERO) e mieloperoxidasas (MPO), associadas à eliminação de formas epimastigotas de Tulahuén de *T. cruzi* (CARDONI, R.L. et al., 1982). Um estudo conduzido por Chen e colaboradores em 2001 mostrou um papel importante dos neutrófilos na sobrevivência de camundongos infectados com formas tripomastigotas de Tulahuén de *T. cruzi*. Foi observado neste estudo que dependendo da linhagem isogênica utilizada, a depleção de neutrófilos através de um anticorpo monoclonal diminuiu a sobrevivência de camundongos BALB/C comparados com o isotipo controle, mas não foi observada diferença na sobrevivência em camundongos C57BL/6 (CHEN, L. et al., 2001). Em outro estudo, foi demonstrado que a injeção intraperitoneal do composto glicoinositolfosfolípideoS (GIPL) presente na superfície de *T. cruzi* estimulou a migração de neutrófilos (Gr-1/Mac-1^{positivo}) três horas após administração para o local de infecção (OLIVEIRA, A.C. et al., 2004).

Estudos mais recentes corroboram com os achados anteriores demonstrando que os neutrófilos desempenham um papel fundamental na defesa contra infecções por *T. cruzi*. Em 2014, um trabalho realizado por Luna-Gomes e colaboradores mostrou que células polimorfonucleares viáveis são necessárias para o controle de parasitemia em co-cultura com macrófagos peritoneais *in vitro*. Foi demonstrado, neste trabalho, o papel da elastase liberada por neutrófilos como tripanocida e consequente diminuição do número de parasitos *in vitro* (LUNA-GOMES et al., 2014). Por fim, também foi evidenciado que os antígenos solúveis da cepa Y de *T. cruzi* são capazes de estimular neutrófilos a produzirem NET e ERO, no entanto as NET não são capazes de eliminar os parasitos, mas sim diminuem sua infectividade (SOUSA-ROCHA et al., 2015).

1.4 Siglecs (*Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins*)

Estes receptores pertencem ao grupo de lectinas do tipo I que reconhecem carboidratos do tipo ácido siálico através de domínios

extracelulares do tipo imunoglobulina (VARKI & ANGATA, 2006). São receptores transmembranares encontrados em sua grande maioria em células do sistema imunológico. A maior parte deles possui um domínio intracelular inibitório ITIM (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) (MACAULEY; CROCKER; PAULSON, 2014). Quando ativados, recrutam fosfatases SHP-1 e SHP-2 que culminam em vias de sinalização para inativação da célula (CARLIN et al., 2009a; VAN KOOYK & RABINOVICH, 2008). Os domínios ITIM da célula quando ativados são capazes de modular vias intracelulares na célula inibindo-as. Alguns estudos demonstram que a ativação dos receptores Siglec através da ligação de seus agonistas são capazes de interferir na resposta imune inata, cascatas de sinalizações intracelulares e crescimento celular (CROCKER & REDELINGHUYS, 2008; WANG et al., 2010).

As Siglecs que são majoritariamente expressas na superfície de neutrófilos humanos são a Siglec-5 e Siglec-9. Já em camundongos, foi encontrado a Siglec-E (ortólogo da Siglec-9) (MACAULEY; CROCKER; PAULSON, 2014). As Siglec-5 e -9 reconhecem preferencialmente conformações diferentes de ácido siálico, sendo Siglec-5 preferencialmente $\alpha 2,6$ e Siglec-9 preferencialmente $\alpha 2,3$ (BLIXT et al., 2003; CROCKER, PAULSON & VARKI, 2007; ALI et al., 2014).

Diversos organismos patogênicos utilizam ácido siálico como maneira de evadir do sistema imune. Estudos vêm demonstrando que algumas bactérias como *Streptococcus* do grupo B podem se ligar à Siglecs levando a alterações das respostas celulares de defesa e podendo assim favorecer a sobrevivência e infecção no hospedeiro (CARLIN et al., 2007, CHANG et al., 2014). Além de bactérias, protozoários como o *T. cruzi* podem também interagir com os receptores do tipo Siglec. Já foi demonstrado que a cepa Tulahuén de *T. cruzi* se liga a moléculas quiméricas de Siglec-E (Siglec ortóloga da Siglec-9 em humanos). Este achado foi confirmado nesse mesmo estudo no qual foi observado que o parasito interage com Siglec-E expressos em células CHO (do inglês, *Chinese Hamster Ovary*) através de imunofluorescência (ERDMANN et al., 2009).

Diante do exposto, diversos estudos têm demonstrado a relação entre *T. cruzi* e hospedeiro. Já foi evidenciado que um dos mecanismos de infecção que o parasito utiliza é através da enzima TS que retira o ácido siálico das células do hospedeiro para incorporar na sua estrutura para evadir e infectar células do sistema imune (SCHENKMAN et al.,

1994; LEDERKREMER e AUGUSTI, 2009). Os receptores Siglec são encontrados em sua maioria em células do sistema imunológico como neutrófilos. Contudo, pouco se sabe sobre a importância desses receptores e o eixo ácido siálico-Siglec na infecção por *T. cruzi* em neutrófilos humanos.

2. HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que o *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén) infecta neutrófilos humanos através do reconhecimento de receptores Siglec-5 e/ou -9.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a participação dos receptores Siglec-5 e -9 de neutrófilos humanos na infecção por *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén).

3.2. Específicos

- Avaliar a infecção de neutrófilos por *T. cruzi*;
- Avaliar os ligantes de Siglec-5 e Siglec-9 na superfície do *Trypanosoma cruzi*;
- Avaliar o efeito de anticorpos de bloqueio de Siglec-5 e Siglec-9 na infecção de neutrófilos;
- Avaliar a expressão dos receptores Siglec-5 e Siglec-9 em neutrófilos humanos após a infecção com *Trypanosoma cruzi*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Doadores saudáveis

Foram incluídos neste estudo doadores saudáveis entre 18 e 60 anos sem sinais físicos de doenças e livres de enfermidades crônicas e sem estresse declarado. Foram excluídos do estudo doadores menores de 18 anos e maiores de 60 anos e também doadores que apresentaram sinais físicos de doenças e enfermidades crônicas e estresse declarado.

Após aceitar participar da pesquisa e assinar o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE), foi coletado 4mL de sangue de cada doador em tubos vacutainer contendo EDTA (BD Biosciences, EUA). Sangue foi levemente homogeneizado e preparado para os experimentos. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética sob protocolo: CAAE: 82425717.0.0000.0121.

4.2 Separação de neutrófilos humanos por gradiente de Percoll®

Para a separação dos neutrófilos foram utilizadas concentrações de 72%, 63%, 54% e 45% de Percoll® (GE, Healthcare, UK) diluídas em tampão HBSS (do inglês, *Hanks Balanced Salt Solution*). Essas soluções foram adicionadas em tubos cônicos de 15mL na quantidade de 2mL, começando da mais concentrada até a menos concentrada. Em seguida, 2mL de sangue total coletado previamente foi adicionado ao topo do gradiente. Com cuidado, os tubos foram centrifugados a 600g com aceleração e desaceleração lentas por 33 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, foi retirado com auxílio de pipeta a camada de células correspondentes aos granulócitos e esse conteúdo foi passado para um novo tubo cônico de 15mL onde passou pela etapa de lise de eritrócitos. A lise celular foi realizada com tampão de lise 1x (Biolegend, EUA) o qual foi adicionado 13mL, tubo foi levemente homogeneizado e deixado em repouso por 7 minutos. Após o repouso, os tubos foram centrifugados a 300g por 7 minutos e tempo de aceleração e desaceleração lentos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e células foram lavadas com 15mL de solução HBSS 1x e centrifugadas a 300g por 7 minutos e tempo de aceleração e desaceleração lentos. Após centrifugação, sobrenadante foi descartado e pellet ressuspendido em meio RPMI (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute* – Gibco, USA) para os experimentos.

4.3 Obtenção das formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuén

Formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Tulahuén foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Mario Steindel (Laboratório de Protozoologia, UFSC) e foram mantidas *in vitro* em cultura de células de Fibroblasto de Camundongo (L929) em meio RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF) 10%, L-Glutamina (Sigma, EUA), Penicilina-estreptomomicina (10,000 U/mL) (Gibco, USA) duas vezes por semana.

Para obtenção das formas tripomastigotas, o sobrenadante da cultura de células foi coletado e adicionado em tubo cônico de 15mL. Após este processo, o tubo foi centrifugado a 1850 g por 10 minutos e logo em seguida colocado na posição vertical em estufa de CO₂ por 1h para que as formas tripomastigotas nadem para o sobrenadante. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado com cautela e passado para um novo tubo. Uma alíquota foi retirada para realização da contagem dos parasitos em Câmara de Neubauer.

4.4 Avaliação da presença de ligantes de Siglec-5 e Siglec-9 na superfície do *Trypanosoma cruzi*

Para realização da avaliação dos ligantes de Siglec-5 e Siglec-9 na superfície do parasito foram utilizadas moléculas quiméricas Siglec-5 Fc e Siglec-9 Fc (gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. James Paulson, *The Scripps Research Institute*, La Jolla, USA). Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) foram incubados separadamente com as quimeras na concentração de 3,0 µg/mL por 180 minutos e em seguida lavados e incubados por 40 minutos com anticorpo Goat Anti-Human Alexa-Fluor 488 1:500 (Invitrogen, USA) para reconhecimento da porção Fc da quimera. Após o processo, as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD® FACS Verse. Como controles deste experimento, formas tripomastigotas foram pré-tratadas com neuraminidase (0,2 U/mL) por 30 minutos antes da incubação com os anticorpos e num outro grupo, as formas foram pré tratadas com neuraminidase e em seguida por um doador de ácido siálico 3'-SL (0,5M) por 30 minutos e em seguida foram incubados com os anticorpos complexados com as quimeras.

4.5 Ensaio *in vitro* de infecção de neutrófilos humanos com *Trypanosoma cruzi*

Para este ensaio, os neutrófilos humanos isolados por gradiente de Percoll® foram incubados em meio RPMI com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, no MOI 5 (do inglês, *Multiplicity of Infection*). Para os grupos experimentais os neutrófilos foram pré-tratados 30 minutos antes da infecção com 10 µg/mL de anticorpos neutralizantes anti-hSiglec-5/14 (Clone 194128, R&D System), 10 µg/mL de anti-hSiglec-9 (Clone 191240, R&D System) ou 0,5 mg/mL de α1-Glicoproteína Ácida (AGP) humana (Sigma, USA). A infecção ocorreu por 3 horas em microtubos de 2,0mL em estufa à 37°C, 5% CO₂. Após incubação, 5x10⁴ células em 50µL foram utilizados para centrifugação em CytoSpin3 (Thermo Shandon Cytospin3, USA). Após centrifugação, as amostras foram coradas com panótico rápido (NewProv, Paraná, Brasil) e visualizadas em microscópio de campo claro (Nikon, Eclipse 50i, Japão). Foram contados 300 neutrófilos e os resultados foram expressos em % de neutrófilos infectados.

4.6 Avaliação da expressão dos receptores Siglec-5 e Siglec-9 em neutrófilos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Para avaliação da expressão dos receptores de Siglec-5 e Siglec-9 em neutrófilos humanos isolados foram utilizados anticorpos APC Siglec-5 (Biolegend, USA) e PE Siglec-9 (Biolegend, USA). Os neutrófilos obtidos após 3h de infecção ou que não passaram pela infecção com *Trypanosoma cruzi* foram incubados com Human Fc-Block 1:100 (BD, USA), APC Siglec-5 1:500 e PE Siglec-9 1:50 por 40 minutos a 4° C. Em seguida, células foram lavadas em tampão FACS (PBS 1x pH7,4 + 2mM EDTA + 2% BSA), sobrenadante descartado e precipitado ressuspenso em 200µL de tampão FACS para serem adquiridas no citômetro de fluxo BD® FACS Verse.

4.7 Marcação de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* com sonda fluorescente Syto24®

Formas tripomastigotas foram recolhidas do sobrenadante de cultura de células L929 conforme 4.3. Foi adicionada 50 nM de Syto24® (Life Technologies), homogenizado em vórtex, protegido da luz e incubado novamente em estufa a 37° C por 30 minutos. Após incubação, os tubos foram novamente centrifugados a 1850 g, 10 minutos à temperatura ambiente, sobrenadante foi retirado e pellet

ressuspendido em 1mL. Em seguida, retirou-se uma alíquota, foi diluída na proporção 1:50 para que seja realizada a contagem das formas tripomastigotas marcadas com Syto24® em câmara de Neubauer.

4.8 Marcação de Lectinas biotiniladas SNA e MAA com Estreptavidina PE

Os neutrófilos e formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram marcados por 45 minutos com SNA biotinilada 1:2000 (Vector) e lavados com tampão PBS e em seguida incubado por 15 minutos com Estreptavidina 1:500 (Biolegend). Para a MAA (Vector) o processo foi mesmo, no entanto o tampão utilizado para realização das lavagens foi HBSS enriquecido com Cálcio (Sigma).

4.9 Ensaio de infecção de neutrófilos humanos por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* marcadas com Syto24®

Neutrófilos humanos foram isolados por gradiente de Percoll® contados e separados nos respectivos grupos experimentais em microtubos de 2,0mL em meio RPMI sem soro contendo $0,5 \times 10^6$ neutrófilos em volume final de 100µL. Paralelamente, formas tripomastigotas marcadas com sonda fluorescente Syto24® obtidas conforme metodologia supracitada foram contadas em câmara de Neubauer, separados nos respectivos grupos e ajustado para MOI 5 ($2,5 \times 10^6$ tripomastigotas) em volume final de 100µL. Após este processo, os neutrófilos foram infectados e tubos foram incubados por 3 horas à 37° C, 5% CO₂. Em seguida, tubos foram lavados com 1mL de tampão FACS (PBS pH7,4 + 2mM EDTA + 2% BSA) e centrifugados a 300g, 7 minutos à 4° C. Após o processo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado com cuidado e precipitado ressuspendido em 200µL de tampão FACS para ser adquirido em citômetro de fluxo.

4.10 Animais

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFSC sob protocolo n° 8787141117.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme a normatização atual do CONCEA e do CEUA/UFSC. Os experimentos com animais foram realizados no Biotério Setorial do MIP localizado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) – CCB – UFSC.

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem isogênica BALB/C com idade entre 6 a 8 semanas pesando de 18-20g. Foram mantidos de 2 a 5 animais em estantes micro isoladoras (Alesco) em gaiolas previamente autoclavadas de polipropileno transparente (29x17x12 cm) e receberam água destilada autoclavada e ração *ad libitum*. Foram controlados os ciclos claro/escuro (12/12h) e temperatura ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$). As trocas foram realizadas semanalmente pelo próprio experimentador em capela de fluxo laminar e tubos PVC (5 cm diâmetro x 10cm comprimento) autoclavados foram utilizados como enriquecimento ambiental. Os animais foram criados no biotério de criação e passados para o biotério de experimentação quando atingirem a idade necessária para os experimentos.

4.11 Diretrizes ARRIVE e pontos finais humanitários

Todos os experimentos e detalhes de procedimento envolvendo animais foram preenchidos pelo experimentador em uma tabela adaptada para as necessidades do laboratório pelo próprio grupo de pesquisa. A tabela foi adaptada de Kilkeni et al. (2010) e se baseia nas diretrizes ARRIVE (do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) reconhecida pelo *National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animal Research* (NC3Rs).

No intuito de priorizar o bem-estar animal, foram definidos neste trabalho pontos finais humanitários para eliminação ética de animais que estiverem passando por algum tipo de dor e sofrimento (distresse).

Foi avaliada medida de peso, durante os experimentos de infecção bem como avaliada medidas de escore clínico (letargia, piloereção, tremores, exsudato periorbital, dificuldade respiratória e diarreia). Destes, foram pontuados de 0 a 4 sendo: 0=não apresenta; 1=pouco/leve; 2=moderado; 3=grave e 4=deverá ser eliminado. Os animais que pontuaram 4 em um único dia, foram humanamente eutanasiados e eliminado do experimento.

Os animais que apresentaram uma perda de mais de 20% de seu peso comparado com o peso inicial foram humanamente eutanasiados.

A eutanásia foi realizada pelo próprio experimentador. Camundongos foram expostos a baixas concentrações de CO₂ para induzir anestesia e posteriormente a altas concentrações de CO₂ para induzir eutanásia. Animais foram colocados individualmente em uma caixa transparente de acrílico contendo uma entrada de gás CO₂. Este

procedimento é realizado em um local fora da sala de experimentação e relativamente distante dos outros animais para evitar estresse.

4.12 Infecção de camundongos BALB/C com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén)

Foram utilizadas para infecção formas tripomastigotas previamente coletadas de sobrenadante de cultura de células L929. Para infecção foram contados 1×10^5 formas tripomastigotas com auxílio de câmara de Neubauer e diluídos em 200 μL de PBS (do inglês, *Phosphate Buffer Solution*). Foram administrados 1×10^5 formas tripomastigotas pela via intraperitoneal.

4.13 Avaliação da curva de parasitemia

Para contagem das formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi utilizado o método de Brener. Os animais foram colocados em um aparato de acrílico (15cm x 10cm x 5 cm) onde o experimentador pôde conter o animal para realização do procedimento. Após contenção, a cauda de cada camundongo passou por um processo de assepsia com álcool iodado e um pequeno corte na porção terminal da cauda foi realizado para obtenção de sangue. Foram coletados 5 μL de sangue e pipetados em lâmina de vidro e em seguida foi colocada lamínula (22mm x 22mm) sobre o sangue. A contagem da parasitemia foi realizada a cada 2 dias em microscópio de campo claro (Nikon Eclipse 50i, Japão) no aumento de 40x. Foi contado o número de formas tripomastigotas em 50 campos. Valores foram expressos em número de tripomastigotas/mL através da seguinte fórmula:

Número de tripomastigotas/mL = N° de parasitos em 50 campos x 36 (Fator de Correção) x 200.

4.14 Contagem de leucócitos totais de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*

Sangue obtido dos animais através da metodologia citada anteriormente foi colocado em microtubos contendo 0,1% de anticoagulante citrato de sódio (Synth, São Paulo, Brasil). Deste tubo, foram realizados esfregaços sanguíneos para realização do diferencial de leucócitos em cada animal. O restante do sangue obtido teve suas hemácias lisadas através de solução de Turk (NewProv, Paraná, Brasil) e leucócitos foram contados com auxílio de câmara de Neubauer. Para a realização da contagem total de leucócitos, o sangue obtido foi diluído

na proporção 1:20 em solução de Turk, o tubo foi homogeneizado e em seguida pipetado 10 uL em câmara de Neubauer para realização da contagem.

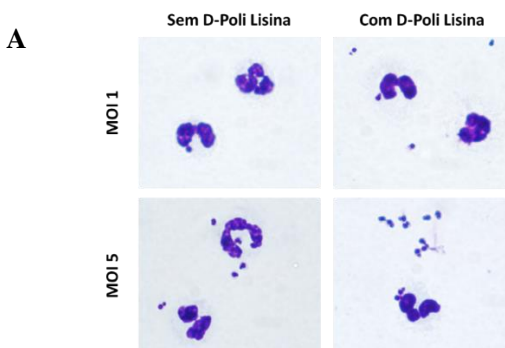
4.15 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas em Software *GraphPad Prism 6.0*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e foram submetidos à análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis seguido de teste post hoc de Dunn quando necessário. Teste de Mann-Whitney U foi utilizado para comparar a média entre dois grupos, quando necessário. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Infecção de neutrófilos humanos com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Este primeiro experimento teve o intuito de observar a taxa de infecção da cepa Tulahuén de *T. cruzi* em diferentes MOI (do inglês, *Multiplicity of Infection*) em neutrófilos humanos. Para isso, após o isolamento dos neutrófilos, 5×10^5 neutrófilos foram incubados por três horas em meio RPMI com 5×10^5 (MOI 1) ou 25×10^5 (MOI 5) formas tripomastigotas da referida cepa. O tratamento com D-Poli-Lisina (Sigma Aldrich, USA) foi utilizado para garantir que as células aderissem na lamínula após infecção. Foi observado que os neutrófilos humanos isolados foram infectados pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi* tanto no MOI 1 ($9,6 \pm 1 \%$) quanto no MOI 5 ($25 \pm 1 \%$) (**Figuras 5A e 5B**). Foi observado que as células aderiram nas lamínulas sem o tratamento com D-Poli-Lisina e que o tratamento das lamínulas com D-Poli-Lisina não alterou significativamente a taxa de infecção nos respectivos MOI 1 ($14,4 \pm 4 \%$) e MOI 5 ($29,4 \pm 2 \%$) bem como a morfologia celular (**Figuras 5A e 5B**). Devido a maior taxa de infecção e a não interferência nesta pelo tratamento com D-Poli-Lisina, foi determinado a utilização de MOI 5 e sem tratamento das lamínulas para os experimentos subsequentes.



B

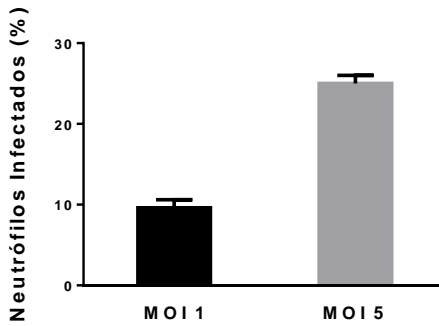


Figura 5. Infecção com formas tripomastigotas de Tulahuén em neutrófilos humanos. (A) Morfologia celular dos neutrófilos isolados em lâminulas não tratadas e tratadas com D-Poli-Lisina em dois diferentes MOI em 3 horas de infecção. (B) Infecção com formas tripomastigotas de em neutrófilos humanos tratados ou não com D-Poli-Lisina em dois diferentes MOIs. Valores de infecção demonstrados em % \pm erro padrão da média.

5.2 Avaliação da presença dos ligantes de Siglec-9 e Siglec-5 na superfície da cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi*

Neste experimento a pergunta a ser respondida era se haveria ligantes que seriam reconhecidos por Siglec-9 e/ou Siglec-5 na superfície do *T. cruzi*. Para isso, utilizamos moléculas quiméricas de ligantes de Siglec-9 e Siglec-5 complexados com uma porção Fc humana na concentração de 3,0 $\mu\text{g/mL}$ que seria reconhecida previamente por um anticorpo secundário anti humano IgG AlexaFluor 488. Como controle do experimento, foi realizado um grupo experimental tratado com neuraminidase e outro grupo com doador de ácido siálico 3-*Sialyl-lactose* (3-SL). Foi observado que Siglec-9 (4,84% eventos positivos para AlexaFluor 488), mas não Siglec-5 (0,60%) se liga na superfície do parasita nesta concentração. O tratamento com neuraminidase não diminuiu de maneira significativa a ligação das quimeras de Siglec-9 e Siglec-5 (3,21% e 0,46%, respectivamente) e o tratamento com doador de ácido siálico aumentou a porcentagem de eventos positivos para ambos Siglec-9 (4,57%) e Siglec-5 (0,98%) (Figura 6).

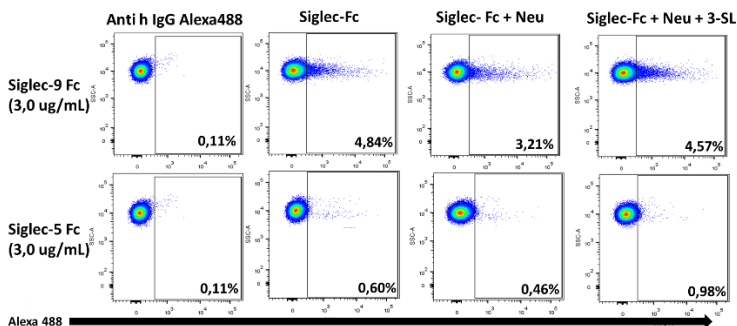


Figura 6. Ligantes de Siglec-9 e Siglec-5 na superfície da cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi*. Dotplots representativos da porcentagem de eventos positivos para o canal de fluorescência AlexaFluor 488 em diferentes grupos. *Anti-human IgG Alexa488*: Controle Negativo anti-h IgG, *Siglec-Fc*: moléculas quiméricas de Siglec-9 ou Siglec-5 complexadas com anticorpo secundário AlexaFluor 488, *Siglec-Fc + Neu*: Tratamento com neuraminidase, *Siglec-Fc + Neu + 3-SL*: tratamento com neuraminidase e após com *3-sialyl-lactose*. Neu = neuraminidase. Foram realizadas duas réplicas biológicas. Experimento realizado três vezes. Figura representativa de um dos experimentos.

5.3 Avaliação da taxa de infecção após pré-tratamento com anticorpos neutralizantes dos receptores de Siglec-5 e Siglec-9 e proteína de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida (AGP)

Após observar uma possível participação dos receptores Siglec-5 e/ou Siglec-9 no experimento de ligantes destes receptores, decidiu-se avaliar o efeito dos anticorpos neutralizantes de Siglec-9 e Siglec-5 e um ligante de Siglec-5 na infecção por *Trypanosoma cruzi*. Os resultados mostraram que o pré-tratamento com os anticorpos neutralizantes de Siglec-5 e Siglec-9 reduziram significativamente a infecção ($47,75\% \pm 4,36$, $p < 0,01$ e $43\% \pm 6,7$, $p < 0,01$, respectivamente) (**Figura. 7**). A AGP é uma glicoproteína que possui ácidos siálicos em sua estrutura que são reconhecidos por Siglec-5. Curiosamente, o pré-tratamento dos neutrófilos com AGP demonstrou um aumento significativo da infecção em $35\% \pm 2$, $p < 0,05$.

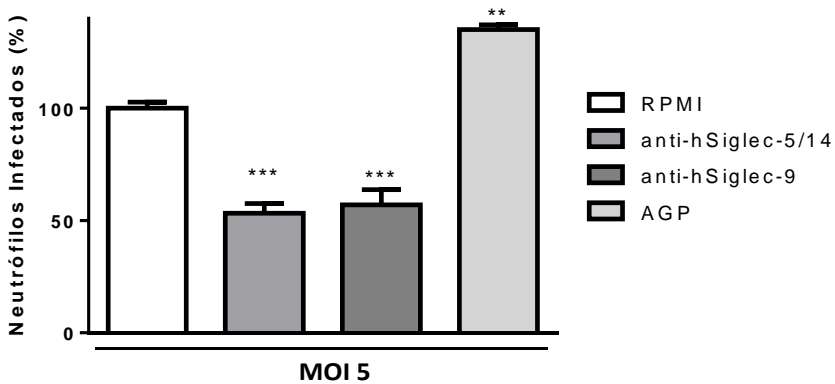


Figura 7. Infecção de neutrófilos humanos pré-tratados com anticorpos neutralizantes de receptores de Siglec-5 e Siglec-9 e proteína de fase aguda alfa-1-glicoproteína ácida (AGP). Grupos experimentais: Controle apenas RPMI, pré-tratado com anticorpos anti-hSiglec-5/14, pré-tratado com anticorpos anti-hSiglec-9 e pré-tratados com glicoproteína AGP. Resultados expressos em % \pm erro padrão da média. ***= $p < 0,01$ e **= $p < 0,05$, $n = 6$ doadores.

5.4 Ensaio de infecção *in vivo* com *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/C: Avaliação de peso, parasitemia, contagem de leucócitos totais e número absoluto de neutrófilos.

No intuito de avaliar a resposta imune à infecção *in vivo*, foi realizada infecção em camundongos isogênicos da linhagem BALB/C. Os resultados mostraram que os animais no 31º dia após infecção tiveram uma redução de $16,29\% \pm 2,60$ de peso comparado com o primeiro dia ($p < 0,0068$) (**Figura 8A**). Além disso, foi observado que a parasitemia teve um aumento mais expressivo a partir do 17º dia ($2,05 \pm 0,85 \times 10^5$ tripomastigotas/mL) atingindo pico no 25º dia pós infecção ($8,75 \pm 6,5 \times 10^5$ tripomastigotas/mL) (**Figura 8B**). A contagem de leucócitos totais apesar de oscilar durante o período de infecção mostra um aumento a partir do 17º dia pós infecção ($5,9 \pm 0,47 \times 10^6$ leucócitos/mL) atingindo um pico no 25º dia ($14,25 \pm 3,2 \times 10^6$ leucócitos/mL) (**Figura 8C**). O número absoluto de neutrófilos foi semelhante à contagem de leucócitos totais, onde observou um aumento a partir do 17º dia pós infecção ($2,23 \pm 0,28 \times 10^6$ neutrófilos/mL) e pico no 25º dia ($8,4 \pm 1,75 \times 10^6$ neutrófilos/mL) (**Figura 8D**).

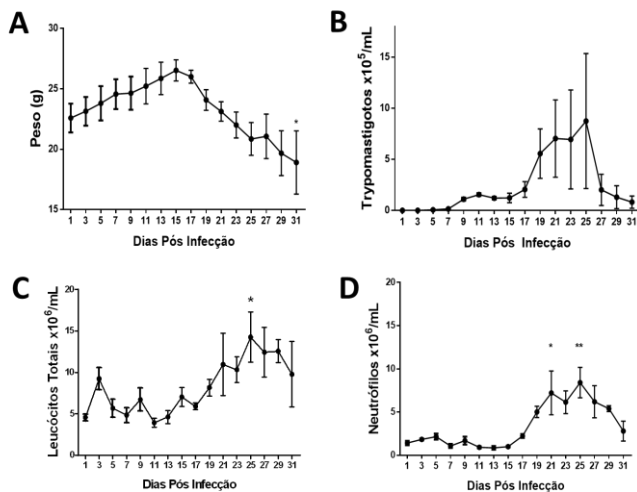


Figura 8. Modelo de infecção *in vivo* com cepa Tulahuén de *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Camundongos BALB/C infectados com 1×10^4 formas tripomastigotas de *T. cruzi* em $200 \mu\text{L}$ de veículo via i.p. Acompanhamento de peso (A), parasitemia (B), contagem de leucócitos totais (C) e contagem de número absoluto de neutrófilos (D). Experimentos realizados com $n=5$ animais. Resultados de peso expresso em gramas (A), parasitemia em tripomastigotas $\times 10^5$ /mL (B), contagem de leucócitos totais em 10^6 células/mL (C) e número absoluto de neutrófilos em 10^6 neutrófilos/mL (D). **= $p < 0,01$, *= $p < 0,05$ em comparação ao primeiro dia após infecção.

5.5 Avaliação dos ligantes de Siglec-5 e Siglec-9 e ligação de lectinas aos ácidos siálicos presente na superfície do *T. cruzi* (Re-isolada)

Após a passagem *in vivo*, a cepa foi cultivada novamente em cultura de células L929 para que fossem realizados os próximos experimentos. Os resultados dessa nova avaliação dos ligantes de Siglec na superfície do parasito mostraram 1,47% (Siglec-5 Fc $20 \mu\text{g}/\text{mL}$) e 1,51% (Siglec-9 Fc $20 \mu\text{g}/\text{mL}$) de eventos positivos para os ligantes. O pré-tratamento com neuraminidase favoreceu a taxa de ligação das moléculas na superfície de Siglec-5 Fc (5,18%) e Siglec-9 Fc (14,5%) (**Figura 9B**). Ao avaliar a presença de ácidos siálicos na superfície do *T. cruzi* por ligação à lectinas biotinizadas demonstrou 60,5% de ligação à *Sambucus nigra* (SNA) e 0,67% de ligação à *Maackia amuriensis* (MAA) (**Figura 9C**).

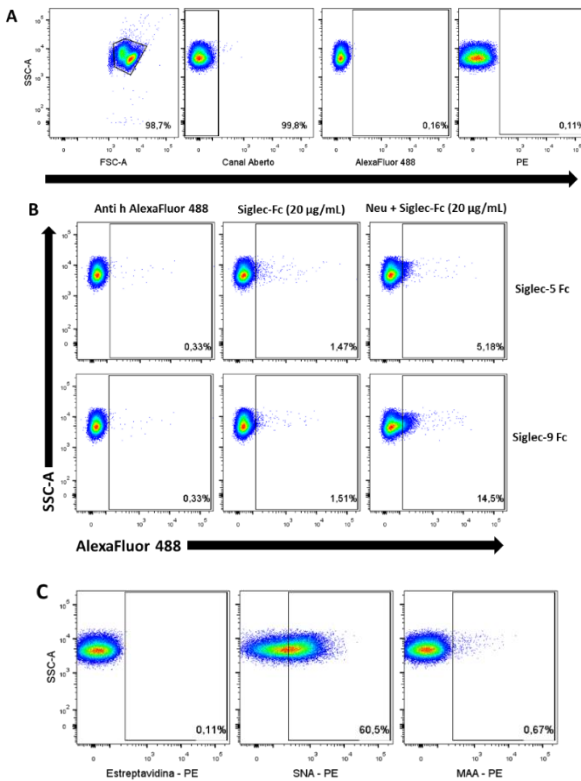


Figura 9. Avaliação da ligação de Siglec-5 e Siglec-9 e de lectinas SNA e MAA na superfície da cepa re-isolada de *T. cruzi*. (A) Estratégia de *gate* utilizada para análise dos dados. (B) *Dotplot* representativo da ligação das moléculas químicas de Siglec-5 e Siglec-9. Grupos experimentais: Anti human AlexaFluor 488 - Controle Negativo, Siglec-Fc: Quimeras complexadas ao anticorpo AlexaFluor488, Neu + Siglec-Fc: cepa Tulahuén pré-tratada com neuraminidase e após incubado com as moléculas químicas complexadas ao anticorpo AlexaFluor 488. (C) *Dotplot* representativo da ligação de: controle negativo (Estreptavidina-PE), lectinas SNA e MAA na superfície do *T. cruzi*. Experimento realizado duas vezes. Figura representativa de um dos experimentos.

5.6 Interação de neutrófilos humanos isolados com formas tripomastigotas de Tulahuén marcadas com Syto24® por citometria de fluxo

A intenção deste experimento foi de refinar os achados do ensaio de infecção por uma metodologia diferente. As formas tripomastigotas foram previamente marcadas com uma sonda fluorescente e intercalante de DNA Syto24® e em seguida foram incubadas com neutrófilos humanos isolados por três horas. Nossos achados mostraram uma taxa de interação de 66,5% com a população sugestiva de granulócitos Iodeto de Propídio (PI)^{neg}. Além disso, foi possível observar uma população Syto24^{low} sugerindo uma população que esteja interagindo menos com *T. cruzi*. Este achado de interação foi superior àquele observado no primeiro experimento de microscopia de campo claro.

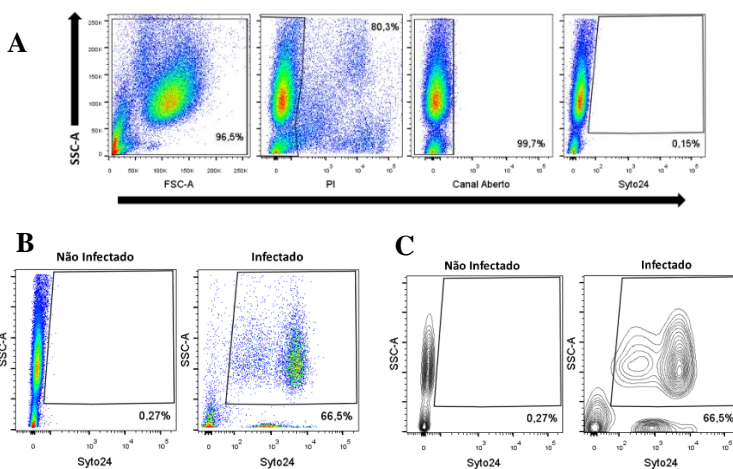
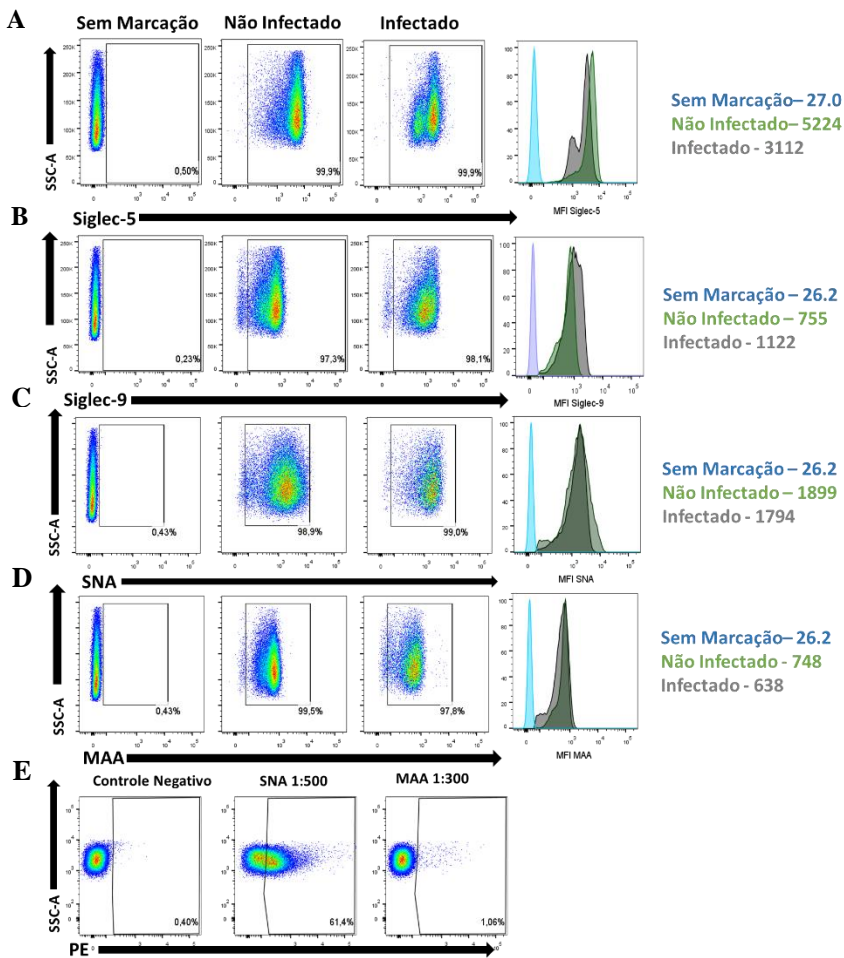


Figura 10. Interação de neutrófilos humanos isolados com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* marcadas com Syto24® em FACS. (A) Estratégia de gate utilizada. (B) 50.000 eventos adquiridos em FACS demonstrados em gráfico *pseudocolor* de células não infectadas e infectadas com *T. cruzi*. (C) 50.000 eventos adquiridos em FACS demonstrados em gráfico de contornos de células não infectadas e infectadas com *T. cruzi*.

5.7 Expressão de receptores de Siglec-5 e Siglec-9 e ligação de lectinas *Sambucus nigra* (SNA) e *Maackia amuriensis* (MAA) na superfície de neutrófilos humanos infectados ou não por *Trypanosoma cruzi*

Neste experimento, neutrófilos humanos foram incubados ou não com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e em seguida, foram incubados com anticorpos conjugados com fluoróforos distintos para avaliação da expressão de receptores por citometria de fluxo. Os resultados demonstraram uma diminuição na mediana de intensidade de fluorescência (MFI) dos receptores de Siglec-5 (1974 ± 1137) após a infecção comparado com neutrófilos não infectados ($2833,5 \pm 2390$) ($p=0,776$) (**Figura 11F**). Curiosamente, observou-se o surgimento de uma nova população Siglec-5^{low} quando neutrófilos são infectados (**Figura 11A**). Por outro lado, foi observado que houve um aumento na expressão dos receptores de Siglec-9 após a infecção (1517 ± 395) comparado com não infectado ($730,5 \pm 25$) ($p=0,185$) (**Figura 11G**) sem surgimento de uma segunda população (**Figura 11B**). Foi observado neste experimento que houve uma redução nos ácidos siálicos presentes na superfície dos neutrófilos humanos após a infecção mediante ligação à lectinas SNA (**Figura 11C**) e MAA (**Figura 11D**). Foi evidenciado uma redução, porém não significativa, na mediana de intensidade de fluorescência das lectinas SNA de 7483 ± 5584 para 4593 ± 502 ($p=0,452$) e MAA que teve uma diminuição na sua MFI de $634,5 \pm 113,5$ para $458,5 \pm 179,5$ ($p=0,494$) (**Figura 11I**) após a infecção (**Figura 11H**). Por fim, foi observado 61,4% de eventos positivos para SNA e 1,06% de eventos positivos para MAA na superfície do *T. cruzi* (**Figura 11E**).



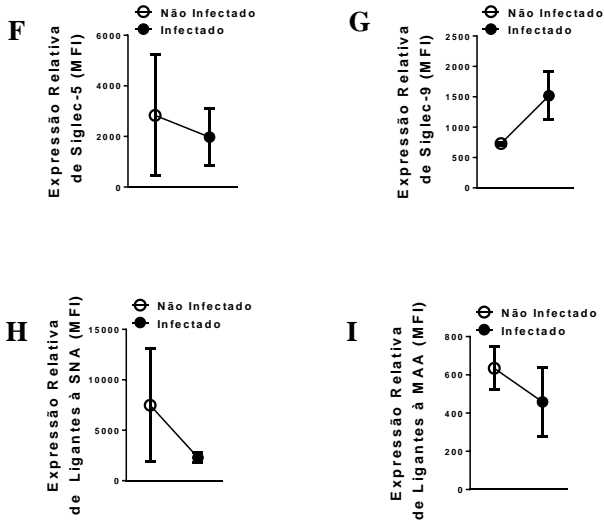


Figura 11. Expressão de receptores de Siglec e ligação de lectinas em neutrófilos infectados ou não infectados por *T. cruzi*. Dotplots representativos de um experimento onde: (A) Expressão de receptores de Siglec-5 e (B) Siglec-9, (C) avaliação da ligação de *Sambucus nigra* (SNA) e (D) *Maackia amurensis* (MAA) em neutrófilos e em *T. cruzi* (E). Expressão relativa dos receptores de Siglec-5 (F), Siglec-9 (G) e expressão relativa de ligantes à SNA (H) e MAA (I) em neutrófilos humanos. Resultados demonstrados em média de MFI \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes no total de 2 doadores.

6. DISCUSSÃO

Foi demonstrado no primeiro experimento que neutrófilos humanos isolados por gradiente de Percoll são infectados por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén) onde 25% dos neutrófilos humanos interagiram com o parasito. Estudos conduzidos por Sanderson e Souza (1979) já haviam previamente demonstrado esse fenômeno com outras cepas de *T. cruzi*. Além disso, já foi demonstrado que neutrófilos são capazes de fagocitar formas epimastigotas da cepa do parasito (RIMOLDI et al., 1981; CARDONI et al., 1982 e VILLALTA e KIERSZENBAUM, 1983) porém, apenas Chen e colaboradores (2001) mostraram em seu trabalho interação do sistema imune com formas tripomastigotas da cepa Tulahuén bem como o papel do neutrófilo na sobrevivência de animais infectados.

Curiosamente, foi observado que a taxa de infecção pelo *T. cruzi* reduziu em quase 50% quando os neutrófilos humanos foram pré-tratados com anticorpos neutralizantes de Siglec-5 e Siglec-9. Embora este experimento falte controles para avaliar se *T. cruzi* retirou de fato o ácido siálico da célula para infectar, pode se inferir que há uma participação dos ácidos siálicos presentes na superfície do *T. cruzi* e estes interagem com os receptores do tipo Siglec na superfície dos neutrófilos como mecanismo de internalização do parasita. Os ácidos siálicos que interagem preferencialmente com Siglec-5 são aqueles que possuem carboidratos em sua cadeia terminal na conformação α -2-6 e os que interagem com Siglec-9 são preferencialmente α -2-3 (JONES, VIRJI E CROCKER, 2003; RAPOPORT et al., 2006; CROCKER, PAULSON E VARKI, 2007; MACAULEY, CROCKER E PAULSON, 2014).

A participação dos receptores do tipo Siglec e a infecção por *T. cruzi* é ainda pouco elucidada. Um dos trabalhos considerados como referência para a realização desta dissertação foi inspirado nos achados obtidos por Erdmann e seus colaboradores (2009) onde eles demonstraram a interação entre formas tripomastigotas de *T. cruzi* e Siglec-E (Ortólogo da Siglec-9 em camundongos). Neste trabalho, eles observaram que 44% de moléculas quiméricas de Siglec-E se ligam à superfície da cepa de *T. cruzi*. Baseado em seus achados, nós decidimos realizar um experimento semelhante, porém utilizando as moléculas quiméricas de Siglec-5 e Siglec-9. Curiosamente, observamos que 8% das moléculas de Siglec-9 e 0,9% das moléculas de Siglec-5 se ligavam à superfície do *T. cruzi*. Essa taxa não aumenta com o aumento da

concentração das quimeras. Uma das possibilidades biológicas para tal fato é que devido à excessiva manipulação *in vitro* da cepa, esta pode ter perdido a expressão da enzima transialidase e conseqüentemente ter diminuído sua infectividade. Uma estratégia adotada neste trabalho foi de reisolar a cepa em animais isogênicos BALB/C com a finalidade de da cepa de *T. cruzi* expressar novamente a TS, bem como avaliar a resposta imune *in vivo*.

A resposta imune *in vivo* à patógenos como *T. cruzi* pode sofrer uma variação conforme a linhagem (ROGGERO et al., 2002) e sexo dos animais do estudo (PRADO JÚNIOR et al, 1998; D'AMBRÓSIO FERNANDES, et al., 2008 e MICUCCI et al., 2010). Os picos de parasitemia de cada cepa de *T. cruzi* são variáveis e característicos de cada cepa (CARNEIRO, ROMANHA E CHIARI, 1991; RODRIGUES et al., 2010;). Nossos achados mostraram que a cepa do parasito apresentou um pico de parasitemia no 21º dia após a infecção em BALB/C. Estes achados corroboram com alguns dados da literatura (HIYAMA et al, 2001; SAEFTEL, FLEISCHER E HOERAUF, 2001), porém o pico de parasitemia pode variar dependendo da quantidade de parasitas administrados e a via de administração (ALBUQUERQUE et al., 2015).

Foi observado em nossos achados um primeiro aumento no número total de leucócitos nos primeiros dias após a infecção. Este resultado é compreensível pois classicamente ocorreu uma resposta imune devido ao patógeno estar presente no organismo infectado (AKIRA, UEMATSU E TAKEUCHI, 2006; IWASAKI E MEDZHITOV, 2010). Após o 19º dia da infecção com *T. cruzi*, foi observado um segundo aumento na contagem de leucócitos totais em sangue total coletado nos animais. Este achado pode ser interpretado pelo aumento do número de parasitas que se encontravam na corrente circulatória e conseqüentemente uma medida para combater esse aumento abrupto das formas tripomastigotas livres (JUNQUEIRA et al., 2010; BERMEJO et al., 2011). Dos leucócitos totais mais presentes neste segundo pico, foi observado que o número de neutrófilos se sobressaía comparado a monócitos e linfócitos. Os neutrófilos são células fagocíticas especializadas para combater infecções de patógenos como o *T. cruzi* (LÓPEZ, et al., 1978; SANDERSON & SOUZA, 1979; RIMOLDI et al., 1981; SOUZA-ROCHA et al., 2015). O aumento do número dessas células é uma medida de combate ao parasito.

Na tentativa de observar um aumento na taxa de ligação às moléculas quiméricas de Siglec-5 Fc e Siglec-9 Fc, foi repetido o

experimento em FACS para avaliação dos ligantes com a cepa Tulahuén re-isolada. Inesperadamente, ambas quimeras tiveram baixa ligação à superfície do *T. cruzi*, sendo: Siglec-5 Fc 1,47% e Siglec-9 Fc 1,50%, mesmo utilizando concentrações equivalentes àquelas utilizadas no trabalho de Erdmann (2009). Adicionalmente, foi acrescentado neste experimento a avaliação dos ácidos siálicos presentes na superfície do *T. cruzi* e observado que os ácidos siálicos que apresentam em sua porção terminal carboidratos na posição α -2,6 tiveram 60,5% de eventos positivos enquanto os de posição α -2,3 apresentaram 0,67%.

As lectinas biotinizadas são ferramentas utilizadas para avaliação da presença de ácidos siálicos na superfície de diferentes tipos celulares. Nossos resultados demonstraram que a lectina *Sambucus nigra* se liga na superfície do *T. cruzi* indicando que há a presença de ácidos siálicos na conformação α -2,6 em sua superfície. Curiosamente, resultados contrários foram encontrados em um ensaio de citometria de fluxo avaliando a mediana de intensidade de fluorescência com concentrações maiores (2 μ g) de lectinas biotinizadas (ERDMANN et al., 2009). Uma possível explicação desse efeito observado é que as células L929 das quais o *T. cruzi* é cultivado in vitro não possuam em sua cadeia terminal ácidos siálicos na posição α -2,3. No entanto, nosso trabalho não investigou quais os ácidos siálicos presentes na superfície das células de linhagem utilizadas em cultura.

Ao avaliar interação entre neutrófilo humano isolado e *T. cruzi* através de citometria de fluxo, foi observado 66,5% de neutrófilos que estão interagindo com *T. cruzi*. A cepa apesar de apresentar baixa ligação às moléculas quiméricas, se mostrou interagir mais com os neutrófilos humanos. Cepas reisoladas podem recuperar sua infectividade (ANDRADE et al., 2006) e esse resultado de aumento de interação sugere que a cepa esteja mais infectiva.

Para finalizar, no intuito de avaliar a expressão dos receptores Siglec-5 e Siglec-9, bem como avaliar os ácidos siálicos presentes na superfície dos neutrófilos humanos após a infecção, um último experimento foi conduzido. Nossos achados demonstraram que a expressão dos receptores Siglec-5 diminuiu enquanto a expressão de Siglec-9 na superfície dos neutrófilos aumentou após a infecção com *T. cruzi* embora de maneira não significativa. Erickson-Müller e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão de Siglec-5 aumentava quando células são estimuladas com fMLP ou TNF- α . Há ainda uma regulação intracelular via endossomos desses receptores culminando na maior produção e exposição desses na superfície da

célula (CROCKER, PAULSON e VARKI, 2007; O'REILLY, TIAN e PAULSON, 2011). O aumento dos receptores de Siglec-9 pode ter se dado pela ativação celular frente à infecção com *T. cruzi* como mecanismo compensatório (WANG et al., 2017; ZENG et al., 2017). Nosso trabalho não investigou vias de sinalização intracelulares que estariam participando deste processo, no entanto sabe-se que os domínios intracelulares ITIM possuem um importante papel no recrutamento de fosfatases como SHP1 e SHP2 na regulação da função imune da célula (MACAULEY, CROCKER E PAULSON, 2014).

Como mencionado anteriormente, os receptores Siglec-5 e Siglec-9 possuem preferência a seus ligantes, sendo Siglec-5 ter preferencialmente ligação à carboidratos na porção terminal α -2,6 e Siglec-9 preferencialmente α -2,3. Os ensaios com lectinas SNA e MAA deste trabalho demonstraram que os ácidos siálicos presentes na superfície da cepa estavam na porção α -2,6. Uma das explicações para a diminuição dos receptores Siglec-5 foi que o *T. cruzi* interagiu com estes receptores e, além disso, utilizou deste mecanismo para ser endocitado para o interior da célula. Alguns autores demonstraram mecanismos de endocitose que *Streptococcus* do grupo B utilizam através da ativação de Siglec-5 (CARLIN et al., 2007). Outro fato é que algumas cepas de *Trypanosoma cruzi* como a Tulahuén, expressam a enzima transialidase (TS) que por sua vez retira os ácidos siálicos de cadeias terminais de carboidratos preferencialmente na porção α -2,3 de outros organismos para incorporá-lo na sua superfície (SCHENKMAN et al., 1994; LEDERKREMER e AUGUSTI, 2009). Um achado que sugere a atividade da TS no último ensaio realizado foi a diminuição do MFI da lectina MAA (de $634,5 \pm 113,5$ para $458,5 \pm 179,5$) na superfície dos neutrófilos após a infecção.

Contudo, os achados obtidos nesse trabalho puderam demonstrar a importância do eixo ácido siálico-Siglec na infecção de neutrófilos humanos por *T. cruzi* cepa Tulahuén.

7. CONCLUSÃO

Os neutrófilos humanos isolados são infectados por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuén) e este mecanismo sugere ser dependente do eixo ácido siálico-Siglec.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S., UEMATSU, S. e TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n.4, pp. 783-801, 2006.

ALBUQUERQUE, J.B. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n.6: e0003849. 2015.

ALI, S.R., et al. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic-paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B *Streptococcus*. **Journal of Experimental Medicine**. v. 211, p.1231–1242, 2014.

AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review Of Immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012.

ANDRADE, S. G. et al. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, pp. 1-8, 2006.

BERMEJO, A. D., et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. **British Society for Immunology**, v. 132, n. 1, pp. 123-133, 2011.

BERN, C. et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. **Journal of the American Medical Association**, v. 298, pp. 2171-2181, 2007.

BLIXT, O. et al. Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, n.3 p.1007-1019, 2003.

BRENER, Z., et al. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 431, 2000.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.

BROWN, K.A. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157-169, 2006.

BURLEIGH, B. A; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**. v.11, p. 701–711, 2002.

CARDONI, R.L. et al., Phagocytosis of the epi and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* by peripheral human leukocytes. **Medicina**, v. 42, n. 5, pp. 495-501, 1982.

CARLIN, A. F. et al. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 4, p. 1231–1237, 2007.

CARLIN, A. F. et al. Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response. **Blood**, v. 113, n. 14, p. 3333–3336, 2009.

CARNEIRO, M., ROMANHA, A.J. e CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from diferente zymodemes and schizodemes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 4, pp. 387-393, 1991.

CHANG, Y. C. et al. Group B *Streptococcus* Engages an Inhibitory Siglec through Sialic Acid Mimicry to Blunt Innate Immune and Inflammatory Responses *In Vivo*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2014.

CHEN, L. et al., Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. **European Journal of Immunology**, v.31, pp. 265-275, 2001.

CROCKER PR, PAULSON JC, VARKI A. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature Reviews Immunology**. v.7, p. 255-266, 2007.

CROCKER, P. R.; REDELINGHUYS, P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 6, p. 1467–71., 2008.

D'AMBRÓSIO FERNANDES, R. et al. Alterations triggered by steroid gonadal hormones in triglycerides and the cellular immune response of *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Veterinary parasitology**, v. 125, n.1-2, pp. 21-27, 2008.

DE LEDERKREMER, R.M. e AGUSTI, R. Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v.62, cap.7 pp.311–366, 2009.

DIAS, J.C.P. Chagas disease: success and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 22, p. 2020-2021, 2006.

DO PRADO JUNIOR, J.C. et al. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 84, n. 2, pp. 100-105, 1998.

ERDMANN, H., et al., Sialylated ligands on pathogenic *Trypanosoma cruzi* interact with Siglec-E (sialic acid-binding Ig-like lectin-E). **Cellular Microbiology**. V. 11, n. 11, p. 1600-1611, 2009.

ERICKSON-MÜLLER, C.L., et al. Characterization of Siglec-5 (CD170) expression and functional activity of anti-Siglec-5 antibodies on human phagocytes. **Experimental hematology**, v.31, n. 5, pp. 382-388, 2003.

FIERRO I.M. et al. Induction of NOS in rat blood PMN *in vivo* and *in vitro*: modulation by tyrosine kinase and involvement in

bactericidal activity. **Journal of leukocyte biology**, v.65, n. 4, p. 508-514, 1999.

FREIRE-DE-LIMA. Et al. The *trans*-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. **Glycobiology**, v.25, n. 11, p. 1142-1149, 2015.

GAUR, D., et al. Recombinant *Plasmodium falciparum* reticulocyte homology protein 4 binds to erythrocytes and blocks invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, pp. 17789-17794, 2007.

HIYAMA, K. et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology research**, v.87, n. 4, pp. 269-274, 2001.

IWASAKI, A. e MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, pp. 291-295, 2010.

JONES, C., VIRJI, M., CROCKER, P.R. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. **Molecular Microbiology**, v. 49, pp. 1213-1225, 2003.

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, e29, 2010.

KILKENNY C, BROWNE WJ, CUTHILL IC, EMERSON M, ALTMAN DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, pp. e1000412, 2010.

KINKEAD, L. C., et al. Bacterial lipoproteins and other factors released by *Francisella tularensis* modulate human neutrophil lifespan: Effects of a TLR1 SNP on apoptosis inhibition. **Cellular Microbiology**, doi: 10.1111/cmi.12795, 2018.

LEDERKREMER, R.M. AND AGUSTI, R. Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. V.62, p.311–366, 2009.

LÓPEZ, A. L. et al., The lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by eosinophils and neutrophils. **International Journal of Parasitology**, v. 8, pp. 485-489, 1978.

LUNA-GOMES, T. et al., Neutrophils Increase or Reduce Parasite Burden in *Trypanosoma cruzi*-Infected Macrophages, Depending on Host Strain: Role of Neutrophil Elastase. **PLoS ONE**, v.9, n.3, pp. 1-8, 2014.

MACAULEY, M. S.; CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 10, pp. 653-666, 2014.

MAGALHÃES, M.D.L, et al. Distinct *Trypanosoma cruzi* isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils. **PLoS ONE**. 12(11):e0188083.

MARIN-NETO, J.A., SIMÕES, M.V., SARABANDA, A.V. Chagas heart disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.72, pp, 247-280, 1999.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 181-218, 2013.

MICUCCI, L.R. et al. Importance of host sex in the development of *Trypanosoma cruzi* infection. **Revista de la Facultad de Ciencias Medicas**, v.67, n.2, pp. 73-76, 2010.

MIYAZAKI, Y. et al., IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Immunology**. v. 15, n. 185, p. 1150-1157, 2010.

MIZANUR, R.M. & POHL, N.L. Bacterial CMP-sialic acid synthetases: production, properties, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, pp. 757-765, 2008.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–82, 2006.

NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. Neutrophils at work. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 602–11, 2014.

O'REILLY, M.K., TIAN, H., PAULSON, J.C. CD22 is a recycling receptor that can shuttle cargo between the cell surface and endosomal compartments of B cells. **The Journal of Immunology**, v.186, pp. 1554-1563, 2011.

OLIVEIRA, A.C. et al., Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipis and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **The Journal of Immunology**, v. 173, pp. 5688-5696, 2004.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. et al., Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 113, pt. 7, pp. 1229-1307, 2000.

PHILLIPSON, M. & KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1381–90, 2011.

RAPOPORT, E.M. et al. Probing sialic acid binding Ig-like lectins (siglecs) with sulfated oligosaccharides. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 71, n. 5, pp. 496-504, 2006.

RIMOLDI, M. T. et al., *Trypanosoma cruzi*: sequence of phagocytosis and cytotoxicity by human polymorphonuclear leucocytes. **Immunology**, v.42, pp. 521-527, 1981.

RODRIGUES, C.M. et al. Coinfection with Different *Trypanosoma cruzi* Strains Interferes with the Host Immune Response to Infection. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v.4, n. 10, e846, 2010.

ROGGERO, E. et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities.

Clinical and experimental immunology. v. 128, n. 3, pp. 421-428, 2002.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in immunology**, v. 32, 10, p. 452-60, 2011.

SAEFTTEL, M., FLEISCHER, B. e HOERAUF, A. Stage-Dependent Role of Nitric Oxide in Control of *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, pp. 2252-2259, 2001.

SANDERSON, C. J. & SOUZA, W. A morphological study of the interaction between *Trypanosoma cruzi* and rat eosinophils, neutrophils and macrophages in vitro. **Journal of Cell Science**, v. 37, pp. 275-286, 1979.

SCHENKMAN, R. P., VANDEKERCKHOVE, F. & SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 3, pp. 898-902, 1993.

SCHENKMAN, S. et al. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, pp. 499-523, 1994.

SCHWARZKOPF, M., et al. Sialylation is essential for early development in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences.**, v. 99, pp. 5267-5270, 2002.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual review of immunology**, v. 23, n. 2, p. 197–223, 2005.

SCHENKMAN, S. et al. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, pp. 567-575, 1992.

SHI, J. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1226–1230, 2001.

SIBILLE, Y.; MARCHANDISE, F. X. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. **The European respiratory journal**, v. 6, n. 10, p. 1529–43, 1993.

SOUSA-ROCHA, D. et al., *Trypanosoma cruzi* and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, pp. 1-16, 2015.

SPILLER, F. et al. α 1-Acid Glycoprotein Decreases Neutrophil Migration and Increases Susceptibility to Sepsis in Diabetic Mice. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1584-1591, 2012.

THORNE, K.J. et al., Phagocytosis and killing of *Trypanosoma dionisii* by human neutrophils, eosinophils and monocytes. **Parasitology**, v. 79, n. 3, pp. 367-379, 1979.

VAN KOOYK, Y.; RABINOVICH, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 593–601, 2008.

VARKI, A. & ANGATA, T. Siglecs-the major subfamily of I-type lectins. **Glycobiology**, v. 16, n. 1, p. 1R–27R, 2006.

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology** . 2nd. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

WANG, B Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. **Annual Review of Nutrition**, v. 29, pp. 177-222, 2009.

WANG, L. et al. Indirect inhibition of Toll-like receptor and type I interferon responses by ITAM-coupled receptors and integrins. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 518–30, 2010.

ZINGALES, B. et al., A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, pp. 1051-1054, 2009.