

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

Avaliação do impacto de uma enzima modificada capaz de reconhecer glicanas α -2,3-sialiladas na evolução da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Talícia dos Santos Silva

**Ribeirão Preto
2019**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do impacto de uma enzima modificada capaz de reconhecer glicanas α -2,3-sialiladas na evolução da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientada: Talícia dos Santos Silva

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 14/02/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Talícia dos Santos

Avaliação do impacto de uma enzima modificada capaz de reconhecer glicanas α -2,3-sialiladas na evolução da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2019.
82 p.: il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Dias-Baruffi, M.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. *Trans*-Sialidase. 3. Ácido Siálico.

RESUMO

SILVA, T. S. **Avaliação do impacto de uma enzima modificada capaz de reconhecer glicanas α -2,3-sialiladas na evolução da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi***. 2019. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é um protozoário flagelado intracelular obrigatório e o agente etiológico da doença de Chagas. Esta parasitose afeta milhões de indivíduos na América Latina, é considerada uma doença negligenciada associada a elevados índices de morbidade e pode ser fatal. Atualmente, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas é uma necessidade urgente para o melhor enfrentamento da doença de Chagas. A *trans*-sialidase de *T. cruzi* (TcTS) é uma enzima ausente em mamíferos capaz de promover a transferência de ácido siálico de glicanas α -2,3-sialiladas do hospedeiro vertebrado para a superfície deste parasita. Este evento é essencial para a invasão celular e a sobrevivência deste protozoário no hospedeiro. Este estudo teve como objetivo investigar o potencial efeito anti-*T. cruzi* de uma enzima modificada, sem atividade catalítica, capaz de reconhecer glicanas α -2,3-sialiladas ("Lectenz®- α -2,3-Specific": SF α -2,3). A potencial atividade inibitória da SF α -2,3 sobre as atividades enzimáticas, hidrolase ou *trans*-sialidase, da TcTS recombinante (rTcTS) foi avaliada por ensaio fluorimétrico ou cromatografia em camada delgada (CCD), respectivamente. O impacto da SF α -2,3 na infecção por *T. cruzi* foi avaliado em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, incluindo ensaios de invasão celular, ação tripanocida, citotoxicidade, parasitemia, e determinação da taxa de sobrevivência de animais infectados. As preparações de rTcTS obtidas foram homogêneas, solúveis e ativas. A SF α -2,3 foi incapaz de bloquear as duas atividades enzimáticas da rTcTS com o uso do substrato ácido 2-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuramínico (MuNANA). A maior concentração de SF α -2,3 (5 μ M) mostrou toxicidade moderada em macrófagos murinos, mas não reduziu a viabilidade celular de formas infectantes de *T. cruzi* (trípomastigotas) e de células LLCMK2. A SF α -2,3 preveniu a infecção por *T. cruzi* em macrófagos peritoneais murinos e em células LLCMK2. Camundongos infectados e tratados com SF α -2,3 exibiram níveis mais baixos de parasitemia e maiores taxas de sobrevivência do que camundongos infectados e não-tratados. Este conjunto de resultados indica que a molécula SF α -2,3 apresenta atividade anti-*T. cruzi*. O efeito antiparasitário de SF α -2,3 pode estar associado à modulação da interação parasito-hospedeiro frente a glicanas α -2,3-sialiladas. Entretanto, novos estudos são necessários para o melhor entendimento do mecanismo molecular do efeito anti-*T. cruzi* da SF α -2,3.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; *trans*-sialidase; ácido siálico; glicanas α -2,3-sialiladas

ABSTRACT

SILVA, T. S. The impact of engineered protein that recognize α 2,3-linked sialo-glycans on the evolution of experimental *Trypanosoma cruzi* infection 2019. 82f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is an intracellular protozoan parasite and the etiologic agent of Chagas disease. This parasitosis affects millions of individuals in Latin America, is considered a neglected disease associated with high levels of morbidity and can be fatal. Currently, the development of new theranostic approaches is an urgent need for better coping with Chagas disease. *T. cruzi* trans-sialidase (TcTS) is an absent mammalian enzyme capable of promoting the transfer of sialic acid from host α -2,3-sialylated glycans to the surface of this parasite. This event is essential for cellular invasion and survival of this protozoan in the host. This study aimed to investigate potential anti-*T. cruzi* effect of a modified enzyme, with no catalytic activity, capable of binding to α 2,3-sialylated glycans (Lectenz®- α -2,3-Specific: SF α -2,3). The potential inhibitory activity of SF α -2,3 on enzymatic activities of recombinant TcTS (rTcTS), hydrolase or *trans*-sialidase, was assessed by fluorometric assay or thin layer chromatography (TLC), respectively. The impact of SF α -2,3 on *T. cruzi* infection was evaluated using *in vitro* and *in vivo* assays including cell invasion assays, trypanocidal test, cytotoxicity, parasitemia, and determination of survival rate of infected animals. The obtained rTcTS preparations were homogeneous, soluble, and active. The SF α -2,3 was unable to inhibit the both enzymatic activities of rTcTS when 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid (MuNANA) was used as substrate. The higher concentration of SF α -2,3 (5 μ M) showed moderate toxicity to macrophages but did not reduce cell viability of infectant forms of *T. cruzi* (trypomastigotes) and LLCMK2 cells. SF α -2,3 prevented *T. cruzi* infection in murine peritoneal macrophages and LLCMK2 cells. Infected and SF α -2,3 treated mice exhibited lower levels of parasitemia and higher survival rates than infected and untreated mice. Together, these results indicate that the SF α -2,3 exhibits anti-*T. cruzi* activity. The antiparasitic effect of SF α -2,3 may be associated with the modulation of parasite-host interaction and/or inhibition of TcTS enzymatic activities on α -2,3-sialylated glycans. However, further studies are needed to better understand the molecular mechanism of the anti-*T. cruzi* effect of SF α -2,3.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Trans-Sialidase; Sialic acids; SiaFind™ α 2,3-Specific Lectenz®

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Trypanosoma cruzi*

Em 14 de abril de 1909, o médico sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano Chagas fez o primeiro diagnóstico da Doença de Chagas ou tripanossomíase americana. Além disso, ele descreveu *T. cruzi* como o agente etiológico desta enfermidade e reportou seus aspectos morfológicos e seu ciclo de vida (CHAGAS, 1909). Em abril de 2019, durante a 72ª assembleia mundial de saúde, o dia 14 abril foi instituído o dia mundial da Doença de Chagas com o objetivo de conscientizar sobre a importância desta doença silenciosa, negligenciada e de caráter cosmopolita (MOLOO, 2019).

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é um protozoário intracelular obrigatório que apresenta como características marcantes a presença de mitocôndria única denominada cinetoplasto e um flagelo (BRENER, 1973). Este parasito pertence ao reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero Trypanosoma, espécie *T. cruzi* (MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA; VICKERMAN, 2004). *Trypanosoma cruzi* é encontrado em diferentes formas evolutivas morfológicamente distintas: amastigota, tripomastigota e epimastigota estas formas evolutivas estão se manifestam conforme o hospedeiro que ocupa, sendo o vertebrado (amastigota, tripomastigota) e invertebrado (epimastigota, tripomastigota metacíclica) (BRENER, 1973; CHAGAS, 1909; DE SOUZA, 1984).

A espécie *T. cruzi* é heterogênea e composta por muitas subespécies possuidoras de elevada diversidade biológica, bioquímica e genética. (ZINGALES et al., 2009). A classificação sistematizada das diversas cepas deste parasito é fundamental para o melhor entendimento e favorecimento de estudos científicos relacionados aos diferentes aspectos morfológicos, ecológicos, epidemiológicos, patológicos, manifestações clínicas e abordagens diagnósticas-terapêuticas associados à Doença de Chagas (ZINGALES et al., 2012). Várias estratégias de classificação de cepas de *T. cruzi* já foram descritas de acordo com critérios morfológicos, tropismo celular, virulência, suscetibilidade a fármacos, patogenicidade e perfil eletroforético de isoenzimas (FILARDI; BRENER, 1984; MILES et al., 1977; TIBAYRENC; AYALA, 1988).

Na década de 70, estudos identificaram populações de *T. cruzi* segundo padrões genéticos, reforçando, então, uma diversidade genética entre cepas de *T.*

cruzi à qual foi associado um perfil na caracterização biológica, morfológica e patogênica do ponto de vista epidemiológico. De acordo com esses critérios, podemos citar a cepa Y com característica reticulotrópica por apresentar tropismo preferencial por células hematopoiéticas, fibroblastos e exibindo uma forma delgada. Classificadas como miotrópicas temos as cepas Colombiana, CL, Brazil, e Tulahuen por seu tropismo preferencial por células musculares cardíacas e esqueléticas, além de apresentar a forma larga (MELO; BRENER, 1978a; MILES et al., 1977; MOREL et al., 1980; ROMANHA, 1982).

Com base em aspectos morfológicos e de tropismo celular este protozoário pode ser classificado em dois grupos (ANDRADE et al., 1985; BRENER; CHIARI, 1963; MELO; BRENER, 1978a). Um deles composto por cepas afiladas reticulotrópicas com tropismo por células hematopoiéticas e fibroblastos (como a cepa Y) e o outro as cepas largas miotrópicas com tropismo para tecido muscular cardíaco e esquelético (como as cepas CL, Brazil, Tulahuen e Colombiana). A identificação destas cepas por critérios morfológicos e de tropismo tecidual pode ser otimizada por sua combinação com marcadores moleculares presentes no cinetoplasto do parasito (MOREL et al., 1980). Na busca por uma uniformização racional de classificação das diversas cepas de *T. cruzi*, foi proposta uma divisão das subespécies em seis grupos (I a VI), com base em padrões genéticos identificados por estudos de genética de populações/filogenética e denominados de "Discrete Typing Units-DTUs ((TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2012). Cada grupo de DTU representa um conjunto de parasitos que são geneticamente semelhantes e que podem ser identificados por marcadores moleculares relevantes para vários tipos de estudos destes protozoários, incluindo patogenicidade, delineamento de vacinas e medicamentos, interação parasito-hospedeiro e outros (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2009).

Entretanto, mais recentemente, foi reportada a necessidade de uma ampliação desta classificação fundamentada em seis DTUs, uma vez que foi descrito um novo genótipo associado a uma cepa encontrada em morcegos antropogênicos (Tc-Bat/DTU-VI) (LIMA et al., 2015).

No presente trabalho, foi estudado a cepa Y de *T. cruzi* classificada como uma cepa reticulotrópica fina pertencente ao DTU II, isolada no estado de São Paulo, capaz de infectar o homem e considerada a mais utilizada em modelos experimentais

de infecção por *T. cruzi* (MELO; BRENER, 1978a; MOLINA et al., 2020; ZINGALES et al., 2012).

1.2. Doença de Chagas

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas últimas duas décadas houve a propagação da doença de Chagas em regiões não endêmicas, além da infecção de animais domésticos de forma mais intensa desde o início do século XX. Tais fenômenos demonstram que, depois de muitos anos, uma doença restrita à região rural apresentou mudanças no perfil epidemiológico, devido alguns fatores como desmatamento, êxodo rural, além do aumento da mobilidade da população havendo, então, a presença dessa doença fora da América Latina (WHO, 2018).

A doença de Chagas apresenta algumas formas de transmissão, como a vetorial, em que o parasito é transmitido por meio das fezes ou urina do triatomíneo (barbeiro) no local da picada, transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão vertical através da mãe infectada para o filho, oral através da ingestão de alimentos contaminados e transmissão sexual (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; ARAUJO et al., 2017). Por meio dessas formas de transmissão estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo. Ocorrem mais de 10 mil mortes por ano, com maior incidência na América Latina e aproximadamente, 25 milhões de pessoas correm o risco de adquirir a doença (WHO, 2018).

Independente do mecanismo de transmissão em vertebrados, a forma tripomastigota é infectante e capaz de invadir células nucleadas do hospedeiro vertebrado, no seu interior diferencia-se em amastigota, e após um tempo aproximado de 20 a 30 horas inicia-se a replicação por fissão binária (BRENER; GAZZINELLI, 1997). Após um período de latência de 20 a 30 horas, ocorre o processo de replicação a cada 12 horas, seguido da diferenciação para tripomastigotas e, assim, o rompimento da célula infectada, liberando os parasitos para o meio extracelular, sucedendo novas infecções em outras células do hospedeiro (BRENER; GAZZINELLI, 1997). A forma epimastigota está presente somente no intestino do hospedeiro invertebrado triatomíneo (barbeiro), onde se multiplica e diferencia-se na forma tripomastigota metacíclica. Esta forma infectante é eliminada nas fezes e urina sendo capaz de penetrar a pele do hospedeiro vertebrado no local da picada e infectar células (BRENER, 1973; BRENER; GAZZINELLI, 1997) (Figura 1).

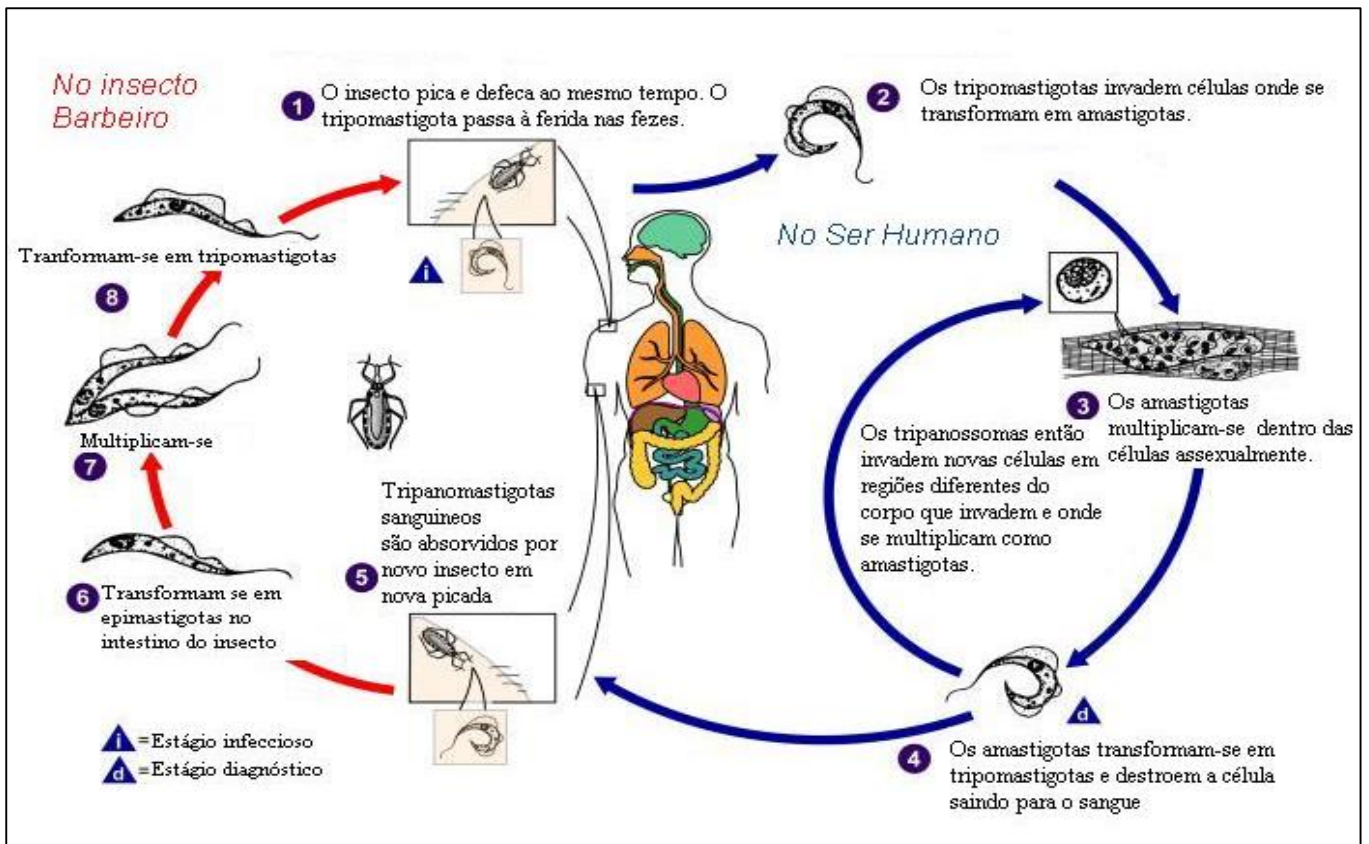


Figura 1: Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* (Modificado de CDC, 2009).

A doença de Chagas exibe um curso clínico bifásico composto por uma fase aguda e outra crônica (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; RASSI; RASSI; MARINETO, 2010). A fase aguda desta doença caracteriza-se por apresentar um período curto de infecção com uma elevada parasitemia transitória, parasitismo de vários tecidos, caráter assintomático ou pela ocorrência de poucos sintomas (febre passageira, linfadenopatia e esplenomegalia brandas) (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; TRUYENS; CARLIER, 2017). O chagoma de inoculação, apesar de ser um sinal patognomônico da fase aguda desta parasitose, apresenta baixa incidência nos pacientes (ECHEVERRIA; MORILLO, 2019; SALES et al., 2017). Após a fase aguda, a doença evolui para a fase crônica que permanece assintomática ou pode evoluir para a forma cardíaca, que se manifesta por meio de insuficiência cardíaca, arritmias, hipertrofia do coração e miocardite crônica, responsáveis pela maior ocorrência de morte em pessoas que possuem essa doença, além de apresentar parasitemia baixa, até mesmo ausência do parasito circulante no sangue. A forma digestiva também se manifesta em pacientes com essa doença, levando a alterações intestinais como

megaesôfago e megacolón (BRENER; ANDRADE; BARRAL-NETTO, 2000; JR; RASSI; LITTLE, 2000; TANOWITZ, 1992).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a ocorrência de casos e surtos da doença de Chagas no período de 2007 a 2016 foram causados por transmissão oral, vetorial domiciliar sem colonização e vetorial extradomiciliar, e os casos registrados e confirmados somam cerca de 200 casos por ano. As principais formas de transmissão no país têm como maior destaque a transmissão oral (69%), seguido de por transmissão vetorial (9%) e por forma de transmissão não identificada (21%). A doença de Chagas está entre uma das quatro maiores causas de morte por doenças infecciosas e parasitárias no Brasil, estimando uma prevalência que variam de 1,0 a 2,4% da população com uma equivalência de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* (SAÚDE, 2018).

Em estudo realizado por (MARTINS-MELO et al., 2014) em que avaliou-se a prevalência da doença de Chagas no Brasil no período de 1980 a 2012, destaca-se que dentre as pessoas infectadas, o sexo feminino apresentou maior e sutil prevalência (4,2%) em comparação com o sexo masculino (4,1%). De acordo com a idade, os maiores de 60 anos tiveram maior prevalência com percentual de 17,7%, e de acordo com a região, residentes nas regiões Nordeste e Sudeste apresentaram prevalência de 5%, localizados em áreas mistas, urbana/rural (6,4%).

Em decorrência de migrações internacionais de pessoas residentes em regiões endêmicas da América Latina para Europa, estima-se que, aproximadamente, 72 mil pessoas latino-americanas infectadas estejam vivendo em países como Espanha, França, Suíça, Itália e Alemanha. A maior prevalência é encontrada em migrantes de origem Boliviana com (18,1%), seguidos pelo Paraguai (5,5%), Argentina (2,2%) e Brasil (0,6%). Também avaliou-se a prevalência em bancos de sangue, unidades pré-natais e em ambiente de cuidados primários, onde estimaram uma prevalência de 0,5%; 6,5% e 8,7%, respectivamente (ECDC, 2014; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2015).

Após mais de 100 anos desde a sua descoberta, há apenas dois fármacos N-heterocíclicos usados para o tratamento da doença, que são o benzonidazol e o nifurtimox, os quais exibem uma eficácia variada, toxicidade e exigem longo tratamento. A maior eficácia no tratamento é na fase aguda da doença, porém o diagnóstico na maior parte das pessoas é confirmado na fase crônica, na qual o tratamento não é efetivo. O principal efeito das drogas consiste em eliminar parasito circulantes, no

entanto não ocorre reversão dos danos cardíacos no paciente. Além das poucas moléculas para o tratamento, ainda não foi descrita nenhuma vacina eficiente contra a infecção por *T. cruzi*, assim como novos métodos sorológicos sensíveis para o diagnóstico desta doença (BERN, 2015; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014; MORILLO et al., 2015; TARLETON et al., 2014).

Os métodos diagnósticos usados atualmente para a doença de Chagas fundamentam-se de acordo com as características das fases aguda ou crônica. Na fase aguda, pode-se detectar as formas tripomastigotas no sangue por meio do exame microscópio ou detecção destas formas de *T. cruzi* pode ser feita pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual apresenta sensibilidade maior. Entretanto, na rotina laboratorial, a reação de PCR ainda não está completamente estabelecida devido ao seu custo relativamente elevado, possíveis contaminações e reações cruzadas, além de dificuldades de padronização. A detecção direta do parasita não é utilizada na fase crônica desta doença devido à escassa parasitemia e baixíssima carga parasitária tecidual. Assim, geralmente, emprega-se métodos sorológicos como *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta, os quais tem como finalidade detectar presença de anticorpos IgG contra antígenos de *T. cruzi* (GOMES; LORENA; LUQUETTI, 2009; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SAÚDE, 2005). A propagação/disseminação da doença de Chagas não se restringe à dificuldade do seu diagnóstico; está associada à privação socioeconômico, acesso limitado aos cuidados médicos e limitações terapêuticas nos grupos de indivíduos mais afetados (DUMONTEIL et al., 2012; RAMSEY et al., 2014; ROCHA-GASO et al., 2017).

1.3. A Interação *T. cruzi* – célula do hospedeiro

A infecção da célula hospedeira pelo parasito *T. cruzi* inclui várias etapas, que ocorrem a partir do reconhecimento e adesão do parasita na célula do hospedeiro por meio de moléculas presentes na superfície do parasito. O reconhecimento é mediado por de glicoproteínas na membrana celular das formas infectantes (tripomastigota) capazes de interagir com moléculas da célula do hospedeiro (BAIDA et al., 2006; BARRETO-BERGTER; VERMELHO, 2010; CÁMARA et al., 2017)

No processo de interação parasito-hospedeiro, destaca-se a proteína trans-sialidase do *T. cruzi* (TcTS) que apresenta um importante papel no mecanismo de invasão. A TcTS é uma enzima ausente em mamíferos com diferentes propriedades

biológicas, tais como atividade enzimática na captura de ácido siálico do hospedeiro que é, então, direcionado para glicoproteína mucina presente na superfície do *T. cruzi* (TcMUC). Esse mecanismo de transferência enzimática é altamente específico na ligação α 2,3 de ácido siálico do hospedeiro e direcionado para TcMUC, incorporada na membrana do parasito (LANTOS et al., 2016; NARDY et al., 2016; SCHAUER et al., 1983).

Em 1975, Alves e Colli identificaram a presença de glicoconjugados na membrana de *T. cruzi*, tendo como componente molecular importante a glicoproteína do tipo mucina, denominada, logo depois, como mucina de *T. cruzi* (TcMUC). Essa molécula é altamente glicosilada, rica em resíduos de tirosina, serina e prolina com 60% de carboidrato, além da presença de aminoácidos hidrofóbicos ancorados por uma porção glicofosfatidilinositol (GPI) à membrana plasmática. A presença dessa glicoproteína em diversos estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* demonstrou sua importância no desenvolvimento do parasito e no processo de reconhecimento e invasão celular (ACOSTA-SERRANO et al., 2001; ALVES; COLLI, 1975).

As glicoproteínas do tipo mucinas são encontradas em mamíferos e estão envolvidas em diversos processos biológicos como transdução de sinal, inflamação, diferenciação celular e carcinogênese. Em comparação com mucinas encontradas em *T. cruzi*, destacam-se algumas diferenças, como o padrão de glicosilação dos peptídeos com carboidratos O-ligados contendo alfa-acetilglicosamina (α GlcNAc) e presença de galactose (Gal) nas posições O-4 e O-6, enquanto que em mucinas de mamíferos há presença de acetilgalactosamina (α GalNAc) substituído por Gal na posição O-3 e O-6 (ACOSTA-SERRANO et al., 2001; BROCKE; KUNZ, 2002; BUSCAGLIA et al., 2006).

A família das TcTS possui ao menos 140 membros que formam três grupos (TS; TS I e TS-e) e que são classificados conforme sua estrutura e função proteica. Tripomastigotas na forma metacíclica presentes (barbeiro) no vetor e na forma tripomastigota que está presente na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, pertencem aos grupos TS e TS I, ambas estão ancoradas pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FRASCH, 2000; UNIVERSITARIA; INTRODUCTION, 2009). Esses grupos possuem características comuns como, uma região catalítica N-terminal e um conjunto de repetições de 12 aminoácidos (SAPA) na região C-terminal (Figura 2A). No entanto, esses grupos demonstram diferença nas suas regiões N-terminais, no grupo TS apresentam atividade enzimática (atividade TS), e o grupo TS I não possui

essa atividade enzimática, mas possui atividade de ligação à β -galactose com semelhança na especificidade à TS ativa, essa inatividade é devido uma mutação Tyr342-His (Figura 2B). As formas epimastigotas presentes apenas no vetor, pertencem ao grupo TS-e e conservam a atividade enzimática (atividades TS), mas não possuem o domínio repetitivo SAPA (COLLI; ALVES, 1999; EUGENIA GIORGI; DE LEDERKREMER, 2011; FRASCH, 2000; UNIVERSITARIA; INTRODUCTION, 2009).

Estudos sugerem que a presença de repetições SAPA imunodominantes modula a produção de anticorpos, principalmente, no sentido de retardar essa produção na fase inicial da infecção e, conseqüentemente, não inibir a atividade catalítica de TS (BUSCAGLIA et al., 1998). Além disso, enzimas com repetições possuem meia-vida maior que outras enzimas que não possuem esse tipo de repetição. A TS faz parte dos principais antígenos de *T. cruzi*, pois é encontrado na maior parte na membrana de superfície nas diferentes formas do parasito (tripomastigota metacíclica, tripomastigotas sanguínea e amastigotas intracelular) que interagem com o hospedeiro (BUSCAGLIA et al., 1998, 2004; ERGUSON, 1997; FRASCH, 2000).

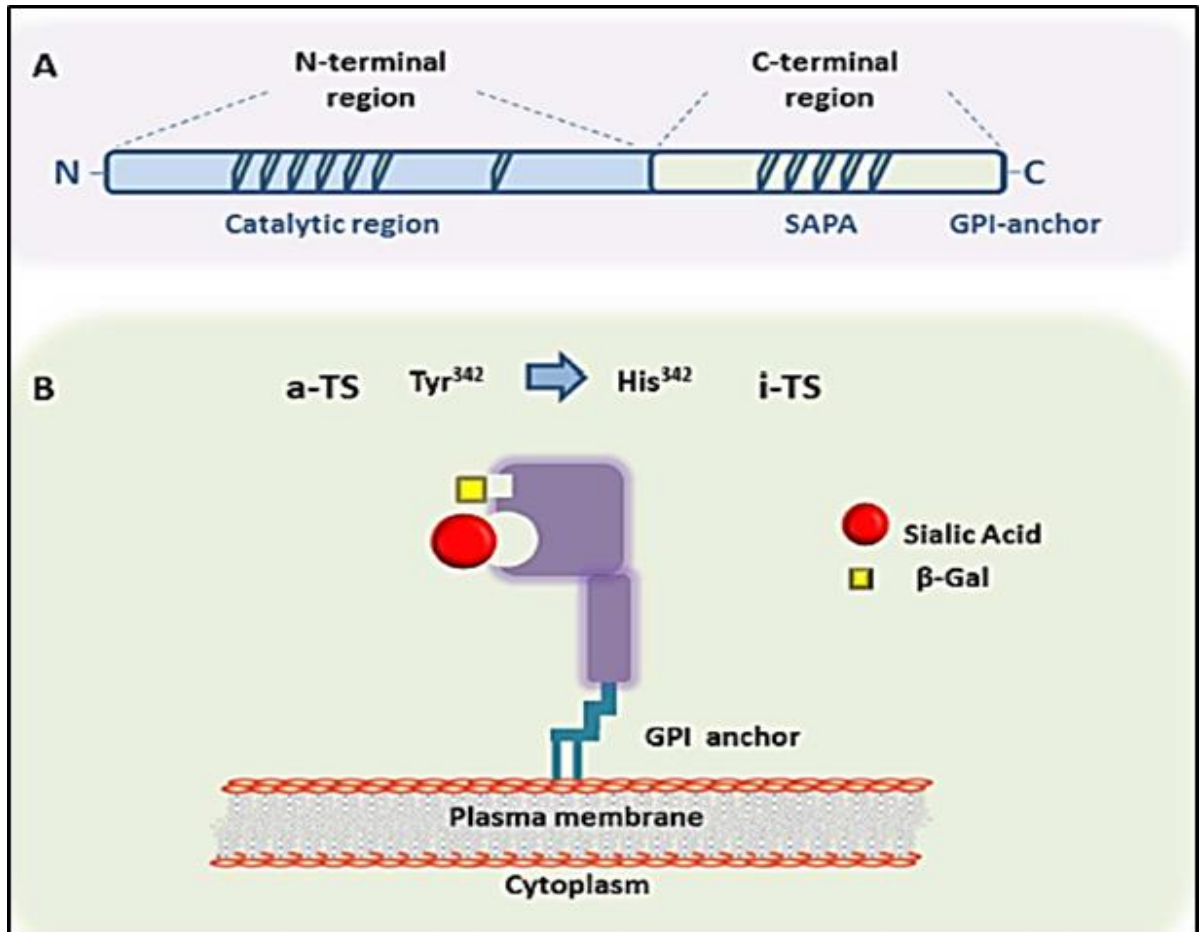


Figura 2: Estrutura trans-sialidase: (A) Estrutura primária, indicando regiões N-terminal e C-terminal. (B) Estrutura dimensional da proteína com regiões de ligação (ácido siálico e β -Gal) (NARDY et al., 2016).

No processo de infecção há presença do envolvimento de moléculas fundamentais como, trans-sialidase e mucina que apresentam papéis importantes na interação do parasito com o hospedeiro. Essa relevância é vista principalmente por essas proteínas serem mais abundantes na superfície do *T. cruzi*, além de ocuparem cerca de 5% do genoma. A diversidade funcional dessas proteínas é extremamente significativa, principalmente na proteção do parasito contra resposta do hospedeiro, bem como, no auxílio para impedir a morte do hospedeiro (DI NOIA et al., 1996; FRASCH, 2000; POLLEVICK et al., 2000). Essa diversidade funcional pode estar relacionada com o surgimento de hipervariáveis de duplicação, mutação e recombinação genética e na coexpressão dessas variáveis, que podem capacitar esse parasito a atenuar a resposta imunológica contra ele. A trans-sialidase é considerada um alvo excelente para desenvolvimento de drogas para o tratamento da doença de chagas, devido sua ausência em mamíferos (AFFRANCHINO et al., 1989;

CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; FRASCH, 2000; NARDY et al., 2016).

A *trans*-sialidase possui duas atividades que são, hidrolase e transferase. Essa enzima catalisa a transferência de ácido siálico da célula do hospedeiro para a glicoproteína mucina do próprio parasito, o processo de transferência se origina a partir de uma ligação α -2,3 do ácido siálico para uma unidade de β -galactose presente no acceptor mucina, processo descrito em 1987 por meio da utilização de fetuínas radioativas (Figura 3) (RIBEIRÃO et al., 1997; ZINGALES et al., 1987).

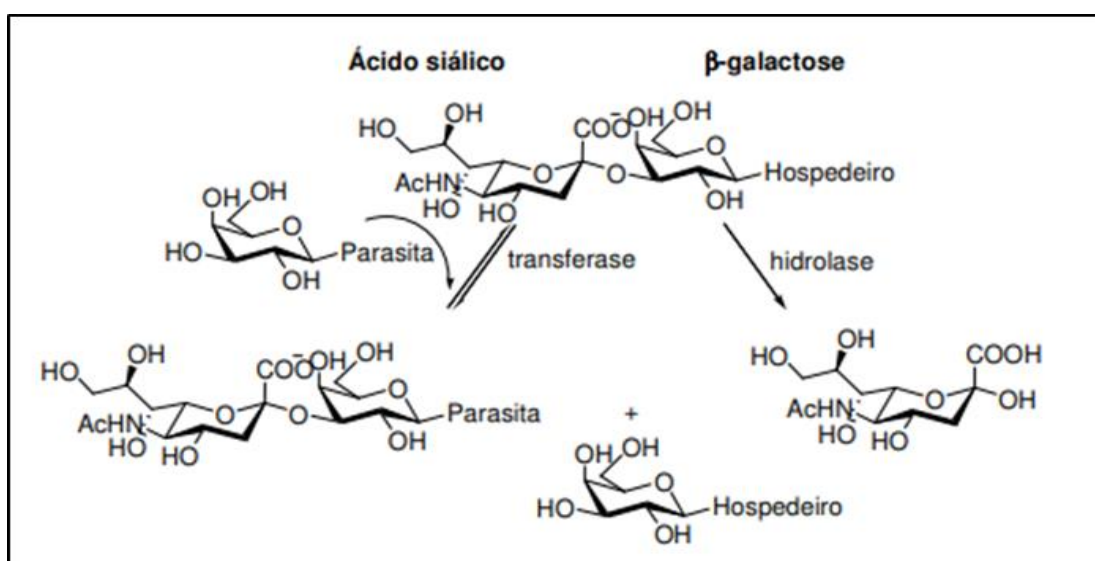


Figura 3: Processo de transferase e hidrolase de ácido siálico pela enzima *trans* sialidase (ANDRADE, 2012).

Os ácidos siálicos (AS), pertencem a uma família de monossacarídeos de nove carbonos localizados na região terminal do glicocálice, no qual compõe glicoconjugados de glicolipídeos, glicoproteínas, âncoras glicofosfolípídeos e proteglicanos (VARKI; SCHNAAR; SCHAUER, 2017). Esses glicoconjugados são encontrados na superfície celular de todas as células de mamíferos e são responsáveis por diferentes funções biológicas como interação célula-célula ou reconhecimentos através da sua carga negativa e sinalização (DA FONSECA et al., 2019a; POLLEVICK et al., 2000).

Em decorrência da evolução, os ácidos siálicos estão presentes na linhagem deuterostoma que inclui vertebrados e alguns invertebrados, e ausentes em muitos outros organismos, como, por exemplo, *Trypanosoma cruzi* (ANGATA; VARKI, 2002; SCHAUER, 2000). Porém, alguns patógenos microbianos não deuterostômicos expressam um ‘mimético molecular’ de ácidos siálicos, bem como em outros

patógenos, há o desenvolvimento de outras ferramentas direcionadas ao ácido siálico e destinadas a invadir os vertebrados (ANGATA; VARKI, 2002; LANTOS et al., 2016; VARKI, 2007).

Em consequência de tornarem-se alvos de muitos patógenos, os ácidos sialicos possuem uma diversificação estrutural e essa falta de conservação nos padrões de sialilação aponta ser um mecanismo de escape de vertebrados contra os patógenos. Entretanto, devido o defeito genético ocasionado na linhagem evolutiva humana, ocasionou o acúmulo de ácido N-acetilneuramínico (Nei5Ac), que é proveniente ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) (ANGATA; VARKI, 2002; VARKI, 1992; VIMR et al., 2004). Contudo, essa alta densidade de ácidos siálicos expresso nas superfícies celulares, podem ser consequências das diversas funções de diferentes reconhecimentos durante a evolução (VARKI, 2007).

Essa atividade enzimática da TS nativa, pode ser observada em um ensaio enzimático com a utilização de TS recombinante e proteínas ricas em ácido siálico como a fetuína, sendo capaz de demonstrar a eficiência ao reproduzir os feitos da TS nativa (AMAYA et al., 2004; DAMAGER et al., 2008; LANTOS et al., 2016; ZINGALES et al., 1987). Considerando essa alta especificidade ao ácido siálico, vários estudos desenvolvem ferramentas direcionadas ao ácido siálico ou à proteína TS para inibição do processo de invasão e, portanto, com potencial ação anti-*T. cruzi* (AGUSTI; GALLO-RODRIGUEZ; DE LEDERKREMER, 2019; ANDRADE, 2012; KASHIF et al., 2017; LARA-RAMIREZ et al., 2017). Por exemplo a proteína recombinante “SiaFind™ α 2,3-Specific Lectenz®”, do tipo lectina com alta afinidade e especificidade ao ácido siálico na ligação α 2,3.

O protozoário *T. cruzi* não sintetiza ácido siálico, portanto, a transferência deste a partir de glicoproteínas do hospedeiro para moléculas de mucina na superfície de parasito é um evento crítico para a sua infectividade e sobrevivência no hospedeiro vertebrado. A sialilação da mucina protege o *T. cruzi* contra mecanismos de defesa do hospedeiro, favorecendo o tropismo tecidual (Figura 4). Devido a incapacidade de sintetizar ácido siálico o parasita então é capaz de transferir e incorporá-lo à mucina, e essa sialilação da molécula de mucina colabora na proteção do parasita contra mecanismos de defesa do hospedeiro, favorecendo o tropismo tecidual (PEREIRA-CHIOCCOLA et al., 2000; PREVIATO et al., 1995; YOSHIDA et al., 1989).

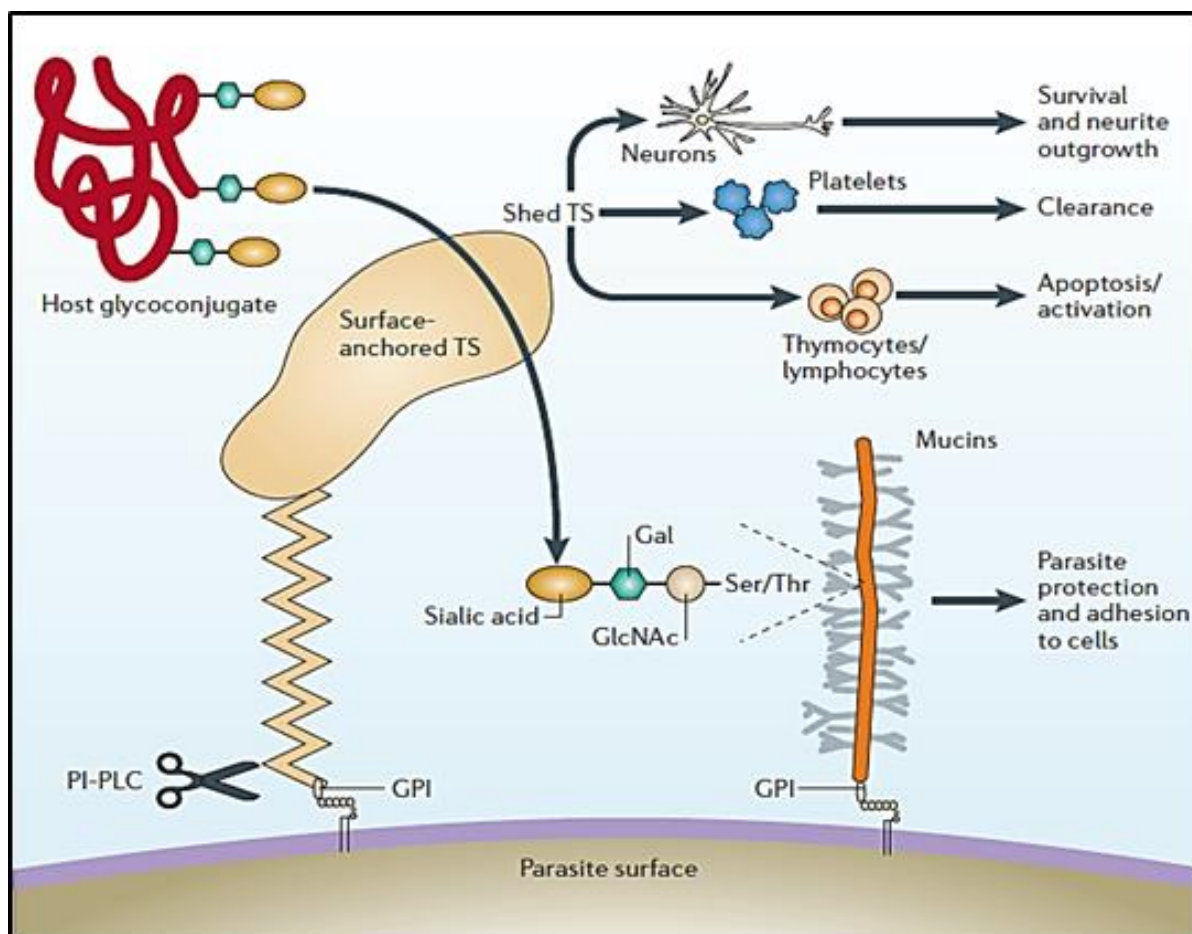


Figura 4: Efeitos biológicos da atividade *Trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) (NOIA, 2006).

1.4. Resposta Imune do hospedeiro na infecção por *T. cruzi*

No início da infecção, a resposta imunológica na doença de Chagas tem como crítica a resposta imune inata com ação de células como macrófagos, células dendríticas, células NK e proteínas do sistema complemento, tendo como papel controlar a replicação do parasito (BRENER; GAZZINELLI, 1997; TARLETON et al., 2007). Além da resposta imune inata, são conhecidos outros mecanismos de resposta para a defesa do hospedeiro, como resposta do tipo Th1, anticorpos líticos anti-*T. cruzi* e a resposta específica de células T CD8+, junto com a produção de IFN- γ dependente de células Th1 capaz de ativar macrófagos com a finalidade de eliminar patógenos intracelulares. Durante todo o mecanismo da resposta imunológica contra a infecção por *T. cruzi*, há uma elevada liberação de mediadores como citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e outros (HUANG et al., 1999; PEREZ et al., 2011; TANOWITZ et al., 2009).

Outros mecanismos observados durante a resposta imune adaptativa envolvem a liberação de TNF- α e IL-12 por células T CD4+, os quais estimulam células T (CD4+ e CD8+) e células NK à liberação de IFN- γ e, assim, ativam macrófagos que desencadeiam a produção de óxido nítrico (NO) e enzimas proteolíticas nos fagolisossomos (GAZZINELLI et al., 1992; MICHAJLOWSKY et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2010; PADILLA; BUSTAMANTE; TARLETON, 2009; TANOWITZ et al., 2009). Com intensa resposta contra a infecção por *T. cruzi* para a eliminação do parasito, e em decorrência de processos inflamatórios que podem causar danos teciduais ao hospedeiro, são necessárias vias de controle como liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) eficazes de evitar esses danos ao hospedeiro (SILVA et al., 1992; SILVA; TWARDZIK; REED, 1991).

Logo no início da infecção, a resposta imune humoral também possui grande importância na defesa do hospedeiro, com a produção de anticorpos IgM e IgG por linfócitos B que reconhecem epítopos localizados em glicoproteínas ancoradas em GPI na membrana do parasito, tal como o epítipo galactosil α -(1,3) galactose (ALMEIDA et al., 1994; GAZZINELLI et al., 1991). Alguns estudos destacaram a importância da atividade de anticorpos líticos mediada pela ação do sistema complemento, como na eliminação dos parasitos e no diagnóstico, e uma característica específica e sensível desses anticorpos é que mesmo anos após a eliminação do parasita ainda estão presentes no sangue (KRAUTZ; KISSINGER; KRETTLI, 2000).

Mesmo com todos os mecanismos imunológicos em resposta contra o *T. cruzi*, parasito é capaz de escapar, apoiando-se em moléculas que são determinantes no processo de evasão da resposta imune. Proteínas presentes na membrana celular do parasito, como as mucinas ancoradas por GPI relacionadas aos processos de evasão e adesão durante a infecção das células do hospedeiro, chamando atenção por ser a molécula mais abundante na superfície do parasito. Outras proteínas de superfície também se destacam nesse processo, como a *trans*-sialidade e proteínas de superfície associadas à mucina (MASPs) (BUSCAGLIA et al., 2006; SERRANO et al., 1995). Ao observar o caráter genético, os genes responsáveis por codificar essa família de proteínas de superfície estão localizados em regiões genômicas, apontando uma organização genômica indicando a importância na codificação dessas proteínas envolvidas no mecanismo de invasão e evasão no hospedeiro (BARTHOLOMEU et

al., 2014; CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016; DE PABLOS; OSUNA, 2012).

A mucina ancorada em GPI leva da modulação à resposta imune, limitando sua ação no controle da parasitemia, ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF e óxido nítrico), devido a estimulação de receptores Toll-like (TLR2, TLR6 e TLR9), o que contribui para a resposta imune retardada e produção de anticorpos contra parasito, além de induzir efeitos imunossupressores em células T com a inibição da produção de IL-2 (ARGIBAY et al., 2002; BUSCAGLIA et al., 2006; CAMPOS et al., 2001; GAZZINELLI; DENKERS, 2006; GRAVINA et al., 2013).

Para estabelecer a infecção, o parasita recorre à mecanismos de invasão e estratégias para escapar de células fagocíticas responsáveis pela ação da eliminação do *T. cruzi*, e uma das principais células infectadas(ANDREWS et al., 1990; SCHENKMAN et al., 1988). O parasito explora recursos como a capacidade de ativação do trifosfato de inositol (IP3), que sinaliza proteínas com ação na mobilização de Ca⁺ intracelular para o citosol que favorecem a fusão de lisossomos da célula hospedeira na entrada do parasito, e essa fusão ao lisossomo forma o vacúolo parasitóforo no interior da célula onde o parasito permanece para a diferenciação em amastigota, replicando-se. Para manter esse vacúolo parasitóforo na célula, a membrana do mesmo possui resíduos de ácidos siálico capaz de protegê-lo da lise, e então para que ocorra o rompimento desse vacúolo acontece o processo de dessialilação e assim a liberação de formas tripomastigotas (HALL et al., 1992; TARDIEUX; NATHANSON; ANDREWS, 1994; WOOLSEY et al., 2003).

A resposta desencadeada contra o *T. cruzi*, demonstra diversos fatores que estão relacionados principalmente na evolução dessa doença, dentre eles, a cepa do parasito, tropismo tecidual, carga parasitaria, tempo de infecção, genética do hospedeiro que influencia no modo da resposta imune. Esses fatores são descritos em diversos estudos, principalmente no uso de modelos experimentais *in vivo* da doença de Chagas, assim como em modelos de camundongos que já estão estabelecidas diferenças como, resistência e susceptibilidade à infecção nas diferentes linhagens de camundongos (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000; ARAUJO-JORGE et al., 1992; DE LANA, 2017).

A definição de resistência e susceptibilidade para linhagens de camundongos experimentais é descrita através do papel funcional de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ no controle da infecção (GONÇALVES DA COSTA et al., 2002; RODRIGUES et al.,

2010). Os linfócitos T CD8+ ao produzir IFN- γ demonstraram controle na infecção por *T. cruzi* em modelos experimentais. No entanto, na ausência de células T CD4+ essa resposta falha ocasionando aumento da parasitemia e o parasitismo tecidual, isso demonstra que células T CD4+ promovem ativação e a proliferação de macrófagos e células T CD8+, respectivamente. Em relação a esse perfil de resposta, o *T. cruzi* por sua vez, propicia ativação da resposta Th2 como mecanismo de escape, devido a resposta ser ineficiente contra o parasito (OLIVEIRA et al., 2010; ROSSI; GONCALVES; RIBEIRO DOS SANTOS, 1984; ROTTENBERG; O'RN, 1998; TARLETON, 2001).

Em consequência desse perfil celular em modelos experimentais, as citocinas possuem papel significativo no controle da replicação do parasito. Em animais susceptíveis e resistentes foram observados dosagem de citocinas IFN- γ e IL-10 também responsável por esse indicador, visto que a citocina IFN- γ é apontada como como fator responsável na destruição do parasito (ABEL et al., 2001; BRENER; GAZZINELLI, 1997; RIBEIRAO et al., 2000). De modo que, ao observar camundongos C57BL/6, a presença de IFN- γ logo no início da infecção e em tempo mais tardio de infecção, há uma mudança para produção de IL-4 e IL-10. Entretanto, em camundongos BALB/c é visto uma produção de IFN- γ mais tardia após a infecção, ocasionando uma parasitemia precoce. Logo, animais que dispõem de resistência à infecção por *T. cruzi* exibem inicialmente citocinas do perfil Th1 e tardiamente citocinas do perfil Th2 tendo um equilíbrio, ao contrário de animais susceptíveis (ANTÚNEZ; CARDONI, 2001; MINOPRIO et al., 1993; REED et al., 1994; TALVANI et al., 2000; ZHANG; TARLETON, 1996).

O sistema imune inato está envolvido inicialmente no reconhecimento do parasito, com destaque aos macrófagos no controle da infecção inicial, os quais além da ação efetora contra o parasito, são também a população de células a sofrerem com o parasitismo inicial. Ação dos macrófagos na fase inicial da infecção é crucial para determinar o desenvolvimento patológico da doença, visto que, em animais resistentes à infecção, observou-se produção de IL-12 e IFN- γ por macrófagos e células NK (ZHANG; TARLETON, 1996). Outra atuação relevante do macrófago está na produção de óxido nítrico (NO). Os derivados de NO, moléculas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio participam na atividade tripanocida. Em estudos conduzidos em modelo experimental *in vivo*, camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* (cepa Y) e tratados com inibidores de oxido nítrico apresentaram aumento da

parasitemia e mortalidade, apresentando, portanto, maior susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (HÖLSCHER et al., 1998; JACOBS et al., 1998; TRIPATHI et al., 2007; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994).

Diferentes patógenos, incluindo *T. cruzi*, são capazes de desenvolver mecanismos distintos para estabelecer a infecção e sua sobrevivência no organismo hospedeiro (DE MEIS et al., 2013; MARSDEN, 1967). Via de entrada do parasito também pode ser um fator que influencia a patogênese da doença de Chagas. Desse modo, alvos iniciais como tecidos e células circulantes podem favorecer a ativação da resposta imunológica e conduzir o controle da infecção (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015; CARADONNA; PEREIRAPERRIN, 2009). Essa associação da via de infecção e o controle do parasito é demonstrada em alguns estudos, por exemplo, foi observado mortalidade maior em animais infectados por via oral em comparação com a via intragástrica, além disto, nestes animais foram observados elevados níveis na produção de TNF por macrófagos, o que pode ser associado à resposta contra o *T. cruzi* e danos teciduais (ANTUNES et al., 2019; BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015; DE MEIS et al., 2013; SANTOS, 2016). Em outro estudo, a citocina IFN- γ foi relacionada com a redução da parasitemia e mortalidade na infecção via intraperitoneal em camundongos, em comparação com animais deficientes de IFN- γ , os quais mostraram alto nível de parasitos circulantes e mortalidade, sendo, portanto, uma citocina relevante na resposta contra o parasito (ANTÚNEZ; CARDONI, 2001; CARDILLO et al., 2015).

1.5. A molécula SiaFindTM α 2,3-Specific Lectenz[®] (SF α -2,3) no contexto da “Glycoscience”

O reconhecimento molecular é um evento crítico em processos biológicos como fertilização, embriogênese, migração celular, formação de órgãos, defesa imunológica, infecção microbiana e outros (SHARON; LIS, 1989). Na literatura, está bem estabelecido que praticamente todas as células expressam carboidratos em suas superfícies na forma de glicoproteínas, glicolipídios e polissacarídeos. Além disso, os carboidratos apresentam um enorme potencial para codificar informações biológicas (COOK, 1986; VARKI; KORNFELD, 2015). O elevado potencial codificador de carboidratos a diversidade e complexidade estrutural destas moléculas orgânicas.

A partir de peptídeos e oligonucleotídeos uma informação biológica pode ser armazenada com base no número de unidades monoméricas e em suas sequências,

enquanto para os carboidratos, as informações também são codificadas de acordo com a posição, a configuração anomérica das unidades glicosídicas e na ocorrência de pontos de ramificação (CANNON, 1987). As dimensões das diversidades estruturais entre essas três categorias de moléculas podem ser ilustradas pelo seguinte exemplo: de modo impressionante, quatro diferentes monossacarídeos podem formar 35.560 tetrassacarídeos distintos, enquanto quatro aminoácidos ou nucleotídeos diferentes podem formar apenas 24 estruturas tetraméricas (CANNON, 1987). Os carboidratos com maior complexidade estrutural, como os oligossacarídeos e polissacarídeos, são conhecidos como glicanas e quando associados a proteínas e/ou lipídeos são designados por glicoconjugados (VARKI; KORNFIELD, 2015). As principais categorias de biomoléculas capazes de interagir com carboidratos/glicanas são os anticorpos, enzimas e lectinas (BARONDES, 1988), sendo que cada categoria apresenta padrões distintos relacionados ao reconhecimento de carboidratos/glicanas.

Enzimas se ligam com elevado grau de especificidade aos sacarídeos e catalizam a geração, modificação e degradação de ligações glicosídicas controlando a complexidade estrutural dessas moléculas (HART; COPELAND, 2010; RINI; ESKO, 2017). Os anticorpos também podem apresentar uma elevada especificidade para glicanas, mas, diferentemente das enzimas, são produzidos em consequência de uma resposta imunológica (JANDUS et al., 2019; MURASE et al., 2009). As proteínas ligadoras de glicanas (do inglês, *glycan-binding proteins* – GBP – (ARTHUR et al., 2015)), também conhecidas como lectinas (do Latim *legere*, escolher–(BOYD; SHAPLEIGH, 1954)) são proteínas não-imunes que reconhecem carboidratos/glicanas sem provocar modificações catalíticas nestes compostos (BARONDES, 1988). Além disso, a afinidade das interações entre lectinas e glicanas é caracteristicamente baixa, com valores de constantes de dissociação da ordem de μM a mM . Assim, interações multivalentes entre lectinas e suas glicanas ligantes são necessárias para as suas funções biológicas (PAULSON; BLIXT; COLLINS, 2006).

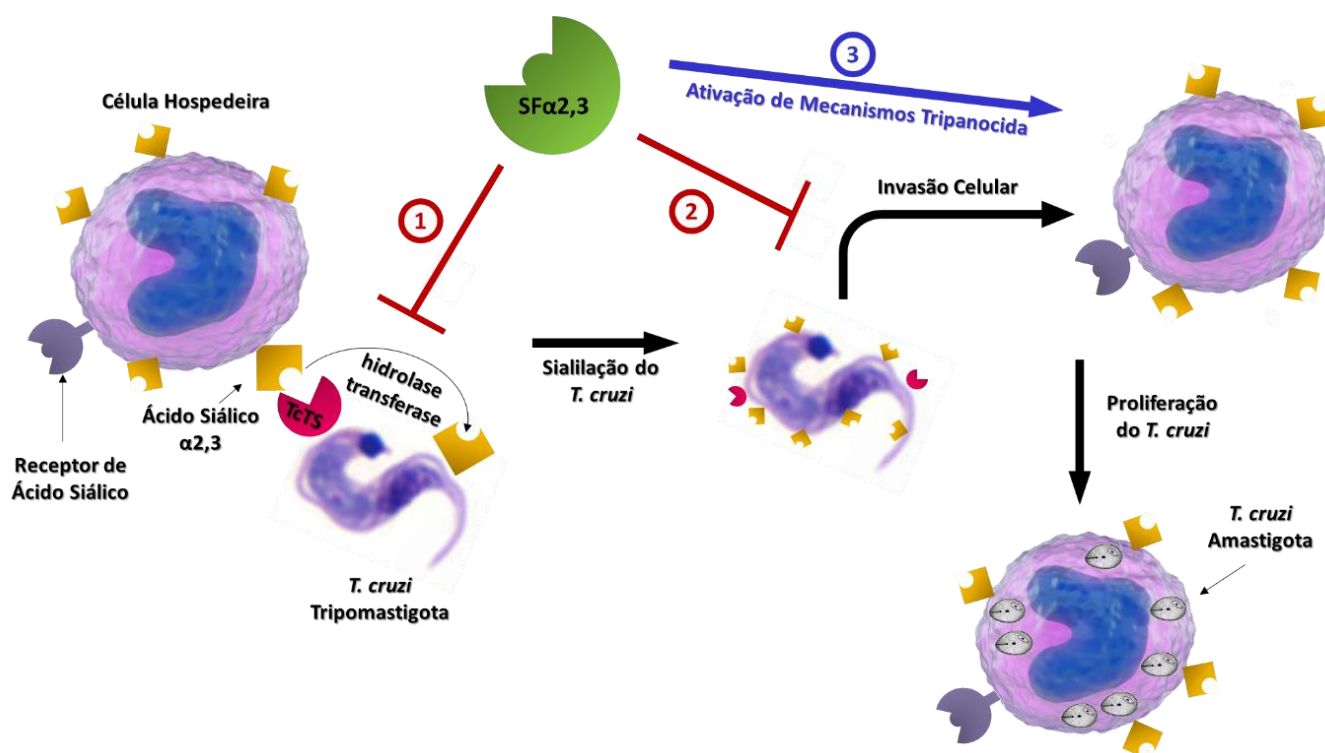
Atualmente, o estudo da síntese e do reconhecimento de glicanas complexas e glicoconjugados, denominado “glycosciense”, é considerado fundamental para as ciências básicas e aplicadas, para a saúde humana, a ciência dos materiais e as energias renováveis (HART; VARKI, 2015). Neste contexto, as duas categorias de biomoléculas para detecção específica de glicanas são proteínas ligadoras de glicanas e anticorpos (HART; VARKI, 2015). Entretanto, estas ferramentas analíticas

apresentam limitações quanto a afinidade da interação com as glicanas e a baixa imunogenicidade dos carboidratos. Diante disto, a empresa de biotecnologia Lectenz® Bio (San Diego – CA USA - <https://lectenz.com/lectenz.com>) desenvolveu novas ferramentas analíticas com elevada estabilidade, afinidade e de produção facilmente escalonável (WOODS; LORETTA, 2018). Dentre estes reagentes está o kit (Cat # SK2301 - SF α -2,3) que contém uma proteína recombinante de alta afinidade para glicanas -sialiladas aplicável a detecção, separação ou enriquecimento desta categoria de carboidratos.

Basicamente, a molécula SF α -2,3 é um produto biotecnológico obtido por meio de modificações no gene da enzima α -2,3-sialiltransferase. Tais modificações foram feitas com o uso da tecnologia computacional de evolução molecular dirigida (KISS; PANDE; HOUK, 2013; TREYNOR et al., 2007; VOIGT et al., 2001), por meio do qual foi gerada uma enzima recombinante sem atividade catalítica e capaz de reconhecer seu substrato (ácido siálico- α 2,3) com maior afinidade em relação a enzima nativa.

1.6. Representação gráfica das hipóteses sobre a potencial ação antiparasitária da molécula SF- α 2,3

O potencial efeito antiparasitário da SF- α 2,3 pode estar associado a três hipóteses de ação, combinadas ou não: 1) A SF- α 2,3 inibe as atividades enzimáticas da TcTS (hidrolase e transferase) e a consequente sialilação da mucina na superfície do parasito e esta ação pode desfavorecer os processos de invasão e escape imunológico do *T. cruzi*; 2) A SF- α 2,3 liga-se a glicanas α -2,3-sialiladas na superfície do *T. cruzi* e/ou em células hospedeiras e inibe a interação parasito-hospedeiro dependente do reconhecimento molecular de resíduos de ácido siálico; 3) A SF- α 2,3 ativa mecanismos tripanocidas nas células hospedeiras.



6. CONCLUSÕES

Com base nesse conjunto de resultados foi possível demonstrar que a SF- α 2,3 reduziu, preferencialmente, a infecção por *T. cruzi* em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c elicitados com tioglicolato de sódio. Tal efeito antiparasitário foi confirmado *in vivo*, como indicado pela reversão do fenótipo de susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* em camundongos BALB/c tratados com SF- α 2,3. Entretanto, apesar da preparação de rTcTS estar ativa e homogênea não foi possível determinar, em sistema livre de células, se a SF- α 2,3 interfere ou não nas atividades enzimáticas da rTcTS, com uso do substrato MuNANA. Finalmente, entende-se que a SF- α 2,3 poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas aplicáveis à doença de Chagas.

7. REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C. J. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, n. 1, p. 99–107, 2001.
- ACOSTA-SERRANO, A. et al. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: Structure and biological roles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 143–150, 2001.
- AFFRANCHINO, J. L. et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 221–228, 1989.
- AGUSTI, R.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; DE LEDERKREMER, R. M. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. A tool for the synthesis of sialylated oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 479, n. March, p. 48–58, 2019.
- AGUSTI, R.; GALLO-RODRIGUEZ, C.; LEDERKREMER, R. M. DE. *Trypanosoma cruzi* trans -sialidase . A tool for the synthesis of sialylated oligosaccharides. v. 479, n. March, p. 48–58, 2019.
- ALMEIDA, I. C. et al. Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas' disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical journal**, v. 304 (Pt 3, p. 793–802, dez. 1994.
- ALVES, M. J.; COLLI, W. Glycoproteins from *trypanosoma cruzi*: partial purification by gel chromatography. **FEBS letters**, v. 52, n. 2, p. 188–190, abr. 1975.
- AMAYA, M. F. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Structure**, v. 12, n. 5, p. 775–784, 2004.
- ANDRADE, P. DE. Planejamento , síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima trans -sialidase de *Trypanosoma cruzi*. p. 53, 2012.
- ANDRADE, S. G. et al. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 79, n. 4, p. 397–407, 1985.
- ANDREWS, N. W. et al. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, jun. 1990.
- ANGATA, T.; VARKI, A. No Title. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 22127, 2000.
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical diversity in the sialic acids and related α -keto acids: An evolutionary perspective. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 439–469, 2002.
- ANTUNES, D. et al. Oral Route Driven Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Unravels an IL-6 Dependent Hemostatic Derangement. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–10, 2019.
- ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. Early IFN- γ production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v. 79, n. 3, p. 189–196, 2001.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. DE; CASTRO, S. L. DE. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. [s.l: s.n.].

- ARAUJO-JORGE, T. C. et al. Trypanosoma cruzi: Enhanced alpha-macroglobulin levels correlate with the resistance of BALB/cj mice to acute infection. **Parasitology Research**, v. 78, n. 3, p. 215–221, 1992.
- Araujo, P et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 112, p. 437-446, 2017.
- ARGIBAY, P. F. et al. Trypanosoma cruzi surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible. **Glycobiology**, v. 12, n. 1, p. 25–32, jan. 2002.
- ARIOKA, S. et al. Potent inhibitor scaffold against Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1633–1640, 2010.
- ARTHUR, C. M. et al. Evolving Mechanistic Insights into Galectin Functions. In: STOWELL, S. R.; CUMMINGS, R. D. (Eds.). . **Galectins. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. New York: Humana Press, 2015. p. 1–35.
- BAIDA, R. C. P. et al. Molecular Characterization of Serine-, Alanine-, and Proline-Rich Proteins of. **Society**, v. 74, n. 3, p. 1537–1546, 2006.
- BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, n. 12, p. 480–482, 1 dez. 1988.
- BARRETO-BERGTER, E.; VERMELHO, A. B. Structures of glycolipids found in trypanosomatids: Contribution to parasite functions. **Open Parasitology Journal**, v. 4, n. SPEC. ISS.1, p. 84–97, 2010.
- BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J. et al. 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, p. 1–21, 2015.
- BARTHOLOMEU, D. C. et al. Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 12, p. e1004399, 4 dez. 2014.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins) I Geology and Coal Resources of the Cen- tralia-Chehalis District , Lewis and Thurston Counties , Washington. **Science**, v. 119, n. 3091, p. 1954, 1954.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, n. 6, p. 389–396, 1962.
- BRENER, Z. Biology of Trypanosoma Cruzi. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, 1973.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. In: 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações Morfológicas Observadas em Diferentes Amostras de Trypanosoma Cruzi. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 5, n. 5, p. 220–224, 1963.
- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. Immunological Control of Trypanosoma Cruzi Infection and Pathogenesis of Chagas' Disease. **International archives of allergy and immunology**, v. 114, p. 103–110, 1 nov. 1997.

- BROCKE, C.; KUNZ, H. Synthesis of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 3085–3112, 2002.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. The Repetitive Domain of Trypanosoma cruzi trans-Sialidase Enhances the Immune Response against the Catalytic Domain. p. 431–436, 1998.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. The Surface Coat of the Mammal-dwelling Infective Trypomastigote Stage of Trypanosoma cruzi Is Formed by Highly Diverse Immunogenic Mucins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 16, p. 15860–15869, 2004.
- BUSCAGLIA, C. A. et al. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, 2006.
- BUSCHIAZZO, A. et al. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in Trypanosoma cruzi pathogenesis. **Mol. Cell**, v. 10, p. 757, 2002.
- BUTLER, C. E. et al. Trans-sialidase Stimulates Eat Me Response from Epithelial Cells. **Traffic**, v. 14, n. 7, p. 853–869, 2013.
- CÁMARA, M. DE LOS M. et al. The Trypomastigote Small Surface Antigen (TSSA) regulates Trypanosoma cruzi infectivity and differentiation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1–21, 2017.
- CAMILLA ALVES SANTANA. Influência da via de transmissão do Trypanosoma cruzi na carga parasitária e produção de anticorpos específicos. **Universidade de Brasília – UnB**, 2015.
- CAMPO, V. et al. Antibodies against mucin-based glycopeptides affect Trypanosoma cruzi cell invasion and tumor cell viability. **ChemBiochem**, v. 15, n. 10, p. 1495–507, 2014.
- CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 1, p. 416–423, jul. 2001.
- CANNON, J. G. Stereochemistry of organic and bioorganic transformations. Wilhelm Bartmann and K. Barry Sharpless. VCH Publishers, Weinheim, FRG. 1987 x + 330 pp. 17.5 x 24.5 cm. ISBN 0-89573-607-1. \$54.00. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. 9, p. 757, 1 set. 1987.
- CANO, M. E. et al. Synthesis of divalent ligands of beta-thio- and beta-N-galactopyranosides and related lactosides and their evaluation as substrates and inhibitors of Trypanosoma cruzi trans-sialidase. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 10, p. 3073–3086, 2014.
- CARADONNA, K.; PEREIRAPERRIN, M. Preferential brain homing following intranasal administration of trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1349–1356, 2009.
- CARDILLO, F. et al. Immunity and immune modulation in Trypanosoma cruzi infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. 1–8, 2015.
- CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by trypanosoma cruzi during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 1–15, 2016.
- CARVALHO, S. T. et al. A new class of mechanism-based inhibitors for trypanosoma cruzi transsialidase and their influence on parasite virulence. **Glycobiology**, v. 20, n.

8, p. 1034–1045, 2010.

CHACÓN-VARGAS, K. F. et al. Trypanocidal activity of quinoxaline 1,4 Di-N-oxide derivatives as trypanothione reductase inhibitors. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 1–18, 2017.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHAUSSABEL, D. et al. CD40 ligation prevents *Trypanosoma cruzi* infection through interleukin-12 upregulation. **Infection and immunity**, v. 67, n. 4, p. 1929–1934, abr. 1999.

CHEN, Z. et al. The synthesis and kinetic evaluation of aryl α -aminophosphonates as novel inhibitors of *T. cruzi* trans-sialidase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 158, p. 25–33, 2018.

COHN Z. A ativação de fagócitos mononucleares: Fato, fantasia e futuro. *J. Immunol.* v. 813, p. 816, 1978.

COLLI, W.; ALVES, M. J. M. Relevant Glycoconjugates on the Surface of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 37–49, 1999.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010.

COOK, G. M. Cell surface carbohydrates: molecules in search of a function? **Journal of cell science. Supplement**, v. 4, p. 45–70, 1986.

CORRÊA, R. S. et al. Ruthenium(II) complexes of 1,3-thiazolidine-2-thione: Cytotoxicity against tumor cells and anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhanced upon combination with benznidazole. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 156, p. 153–163, 2016.

CROCKER, P. R.; PAULSON, J. C.; VARKI, A. Siglecs and their roles in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 4, p. 255, 2007.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

DA FONSECA, L. M. et al. Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma Cruzi* Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 164, 2019a.

DA FONSECA, L. M. et al. Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma Cruzi* Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. February, p. 164, 2019b.

DAMAGER, I. et al. Kinetic and mechanistic analysis of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase reveals a classical ping-pong mechanism with acid/base catalysis. **Biochemistry**, v. 47, n. 11, p. 3507–3512, 2008.

DE LANA, M. **Experimental studies of Chagas disease in animal models**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

DE MEIS, J. et al. *Trypanosoma cruzi* entrance through systemic or mucosal infection sites differentially modulates regional immune response following acute infection in

- mice. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. JUL, p. 1–7, 2013.
- DE PABLOS, L. M.; OSUNA, A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. **Infection and immunity**, v. 80, n. 7, p. 2258–2264, jul. 2012.
- DE SOUZA, W. **Cell Biology of Trypanosoma cruzi**. [s.l: s.n.]. v. 86
- DI NOIA, J. M. et al. High diversity in mucin genes and mucin molecules in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 50, p. 32078–32083, 1996.
- DUMONTEIL, E. et al. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: Rationale and prospects. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, p. 1043–1055, 1 set. 2012.
- ECDC. **Assessing the burden of key infectious diseases affecting migrant populations in the EU/EEA: technical report**. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Anais...**Stockholm: 2014
- ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 119–134, 2019.
- ERGUSON, M. I. C. H. A. E. L. A. J. F. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. 1997.
- EUGENIA GIORGI, M.; DE LEDERKREMER, R. M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: An important interplay for the parasite. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 12, p. 1389–1393, 2011.
- FERRERO-GARCIA, M. A. et al. The action of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on glycolipids and glycoproteins. **Eur. J. Biochem.**, v. 213, p. 765, 1993.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. **A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of Trypanosoma cruzi to active chemotherapeutic agents**. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1984.
- FONTANELLA, G. H. et al. Immunization with an engineered mutant trans-sialidase highly protects mice from experimental *Trypanosoma cruzi* infection: A vaccine candidate. **Vaccine**, v. 26, n. 19, p. 2322–2334, 2008.
- FRANCO, L. H. et al. Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to *Leishmania major* infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 32, p. 13087–13096, 2017.
- FRASCH, A. C. C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 282–286, 2000.
- FREIRE-DE-LIMA, L. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 18, p. 13388–13396, abr. 2010.
- FREIRE-DE-LIMA, L. et al. Role of inactive and active *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidasases on T cell homing and secretion of inflammatory cytokines. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–12, 2017.
- GAZZINELLI, R. T. et al. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. **Parasite immunology**, v. 13, n. 4, p. 345–356, jul. 1991.
- GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated

macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European journal of immunology**, v. 22, n. 10, p. 2501–2506, out. 1992.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895–906, dez. 2006.

GOMES, Y. M.; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 115–121, 2009.

GONÇALVES DA COSTA, S. C. et al. *Trypanosoma cruzi*: Infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. **Histology and Histopathology**, v. 17, n. 3, p. 837–844, 2002.

GORCZYCA, W.; WIECZOREK, Z.; LISOWSKI, J. Cell surface sialic acid affects immunoglobulin binding to macrophages. **FEBS letters**, v. 259, n. 1, p. 99–102, dez. 1989.

GRAVINA, H. D. et al. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63100, 2013.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 673–685, 2009.

HALL, B. F. et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 2, p. 313–325, ago. 1992.

HARRISON, J. A. et al. Hydrolase and sialyltransferase activities of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase towards NeuAc- α -2,3-Gal- β -O-PNP. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 2, p. 141–144, 2001.

HART, G. W.; COPELAND, R. J. Glycomics hits the big time. **Cell**, v. 143, n. 5, p. 672–676, nov. 2010.

HART, G. W.; VARKI, A. Future directions in glycosciences. 2015.

HÖLSCHER, C. et al. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1208–1215, 1998.

HUANG, H. et al. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 31, n. 1, p. 75–88, jan. 1999.

JACOBS, F. et al. IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages: Improved control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, n. 1, p. 59–64, 1998.

JANDUS, P. et al. The architecture of the IgG anti-carbohydrate repertoire in primary antibody deficiencies. **Blood**, v. 134, n. 22, p. 1941–1950, 28 nov. 2019.

JR, A. R.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' Heart Disease. **Clin. Cardiol**, v. 23, p.

883–889, 2000.

KASHIF, M. et al. Recent developments in trans-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Drug Targeting**, v. 25, n. 6, p. 485–498, 2017.

KASHIF, M. et al. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of novel phthaloyl derivatives of 3-amino-3-aryl propionic acids as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 252–268, 2018a.

KASHIF, M. et al. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of novel phthaloyl derivatives of 3-amino-3-aryl propionic acids as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **European journal of medicinal chemistry**, v. 156, p. 252–268, ago. 2018b.

KISS, G.; PANDE, V. S.; HOUK, K. N. **Molecular dynamics simulations for the ranking, evaluation, and refinement of computationally designed proteins**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 523

KRAUTZ, G. M.; KISSINGER, J. C.; KRETTLI, A. U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 1, p. 31–34, jan. 2000.

L., V. G. The combinatorial chemistry of nature. **Nature**, v. 384, n. November, p. 11–14, 1996.

LACAVA, Z. G. M.; LUNA, H. The anticlastogenic effect of tocopherol in peritoneal macrophages of benznidazole-treated and ovariectomized mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 305, n. 2, p. 145–150, 1994.

LANTOS, A. B. et al. Sialic Acid Glycobiology Unveils *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote Membrane Physiology. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. 1–29, 2016.

LARA-RAMIREZ, E. E. et al. An in vitro and in vivo evaluation of new potential trans-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi* predicted by a computational drug repositioning method. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 249–261, 2017.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, out. 2011.

LEE, S.-G.; SHIN, D.-H.; KIM, B.-G. Production of sialyloligosaccharides by trans-sialidase catalyzed reaction using fetuin as a sialic acid donor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 742–746, 2002.

LEGUIZAMON, M. S. et al. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 4, p. 1398–1402, out. 1999.

LEPLETIER, A. et al. Thymic atrophy in acute experimental Chagas disease is associated with an imbalance of stress hormones. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1262, n. 1, p. 45–50, 2012.

LIMA, L. et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 166–177, 2015.

- MARSDEN, P. D. Trypanosoma cruzi infections in CFI mice . **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 61, n. 1, p. 62–67, 1967.
- MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 167–174, 2014.
- MARTINS, F. A. **O papel da proteína rP21 na replicação parasitária in vitro na infecção aguda experimental por Trypanosoma cruzi**. [s.l: s.n.]. v. 23
- MATUTINO BASTOS, T. et al. Chemical Constituents of Anacardium occidentale as Inhibitors of Trypanosoma cruzi Sirtuins. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 7, p. 1–13, 2019.
- MEESMANN, H. M. et al. Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. **Journal of cell science**, v. 123, n. Pt 19, p. 3347–3356, out. 2010.
- MELO, R.; BRENER, Z. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. **Journal of Parasitology**, v. 64, n. 3, p. 475–82, 1978a.
- MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. **The Journal of parasitology**, v. 64, n. 3, p. 475–482, 1978b.
- MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during Trypanosoma cruzi infection. **The American journal of pathology**, v. 159, n. 5, p. 1723–1733, nov. 2001.
- MILES, M. A. et al. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of. **Development**, v. 71, n. 3, p. 217–225, 1977.
- MINOPRIO, P. et al. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 151, n. 8, p. 4200–8, 1993.
- MITCHELL, F. L. et al. Insights into the Activity and Specificity of Trypanosoma cruzi trans-Sialidase from Molecular Dynamics Simulations. **Biochemistry**, v. 52, n. 21, p. 3740–3751, maio 2013.
- MOLINA, I. et al. The effect of benznidazole dose among the efficacy outcome in the murine animal model. A quantitative integration of the literature. **Acta Tropica**, v. 201, n. March 2019, p. 105218, 2020.
- MOLOO, A. **World Chagas Disease Day: raising awareness of neglected tropical diseases**. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/news/world-chagas-day-approved/en/>.
- MOREIRA, D.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: Proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1861–1875, 2004.
- MOREL, C. et al. Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11 I, p. 6810–6814, 1980.
- MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic chagas' cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 14, p. 1295–1306,

2015.

MUCCI, J. et al. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3896–3901, 2002.

MURASE, T. et al. Structural insights into antibody recognition of mycobacterial polysaccharides. **Journal of molecular biology**, v. 392, n. 2, p. 381–392, set. 2009.

NARDY, A. F. F. R. et al. Role of *Trypanosoma cruzi* Trans -sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. v. 7, n. March, p. 1–9, 2016.

NERES, J. et al. Continuous fluorimetric assay for high-throughput screening of inhibitors of trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 302–304, 2006.

NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, p. 110–117, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.

NOIA, J. M. DI. *Trypanosoma cruzi* surface mucins : host-dependent coat diversity. v. 4, n. March, p. 229–236, 2006.

OLIVEIRA, A. C. et al. Impaired innate immunity in Tlr4-/- mice but preserved CD8+ T cell responses against *trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or myd88-deficient mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1–16, 2010.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current opinion in immunology**, v. 21, n. 4, p. 385–390, ago. 2009.

PARIS, G. et al. Probing molecular function of trypanosomal sialidases: Single point mutations can change substrate specificity and increase hydrolytic activity. **Glycobiology**, v. 11, p. 305, 2001.

PAULSON, J. C.; BLIXT, O.; COLLINS, B. E. Sweet spots in functional glycomics. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 5, p. 238–248, 2006.

PAVANELLI, W. R.; NOGUEIRA SILVA, J. J. The Role of Nitric Oxide in Immune Response Against *Trypanosoma Cruzi* Infection. **The Open Nitric Oxide Journal**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2010.

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-??-galactosyl antibodies. **Journal of cell science**, v. 113 (Pt 7, p. 1299–1307, 1 maio 2000.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

PEREZ, A. et al. Immunoendocrinology of the Thymus in Chagas Disease. **Neuroimmunomodulation**, v. 18, p. 328–338, 1 set. 2011.

POLLEVICK, G. D. et al. *Trypanosoma cruzi* surface mucins with exposed variant

- epitopes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27671–27680, 2000.
- PREVIATO, J. O. et al. Structural Characterization of the Major Glycosylphosphatidylinositol Membrane-anchored Glycoprotein from Epimastigote Forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 13, p. 7241–7250, 31 mar. 1995.
- PROCHETTO, E. et al. Trans-sialidase-based vaccine candidate protects against *Trypanosoma cruzi* infection, not only inducing an effector immune response but also affecting cells with regulatory/suppressor phenotype. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p. 58003–58020, 2017.
- RAMSEY, J. M. et al. Opportunity cost for early treatment of Chagas disease in Mexico. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2776, abr. 2014.
- RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.
- REED, S. G. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 153, n. 7, p. 3135–40, 1994.
- REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–15, 2015.
- RIBEIRAO, M. et al. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Parasite Immunology**, v. 22, n. 1, p. 49–53, 2000.
- RIBEIRÃO, M. et al. Temperature differences for trans-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Glycobiology**, v. 7, n. 8, p. 1237–1246, 1997.
- RINI, J. M.; ESKO, J. D. Glycosyltransferases and glycan-processing enzymes. In: **Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- RISSE, M. G. et al. Immune system pathogenesis is prevented by the neutralization of the systemic trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* during severe infections. **Parasitology**, v. 134, n. 4, p. 503–510, 2007.
- ROCHA-GASO, M.-I. et al. Biosensors to Diagnose Chagas Disease: A Brief Review. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 11, nov. 2017.
- RODRIGUES, A. A. et al. A recombinant protein based on *Trypanosoma cruzi* P21 enhances phagocytosis. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51384, 2012.
- 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, p. 5–10, 2010.
- ROMANHA, A. J. **Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi***. [s.l.: s.n.].
- ROSSI, M. A.; GONCALVES, S.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/c mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. **American Journal of Pathology**, v. 114, n. 2, p. 209–216, 1984.
- ROTTENBERG, M. E.; O'RN, A. Chagas' Disease. In: DELVES, P. J. B. T.-E. OF I.

(SECOND E. (Ed.). . Oxford: Elsevier, 1998. p. 521–526.

SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2252–2259, 2001.

SALES, P. A. et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SANMARCO, L. M. et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 4, p. 857–869, 2017.

SANTOS, D. S. DOS. Órgãos alvo do *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental de fase aguda da doença de Chagas por transmissão oral. **INSTITUTO OSWALDO CRUZ Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**, 2016.

SAÚDE, M. DA. Consensus on Chagas disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 3, p. 7–29, 2005.

SAÚDE, M. DA. **Doença de chagas**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 11 set. 2018.

SCHAUER, R. et al. The Occurrence of N-Acetyl- and N-Glycoloylneuraminic Acid in *Trypanosoma cruzi*. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, v. 364, n. 2, p. 1053–1058, 1983.

SCHAUER, R. Achievements and challenges of sialic acid research. **Glycoconjugate Journal**, v. 17, n. 7–9, p. 485–499, 2000.

SCHENKMAN, S. et al. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. **Cell**, v. 55, n. 1, p. 157–165, out. 1988.

SCHENKMAN, S. et al. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annual review of microbiology**, v. 48, p. 499–523, 1994.

SERRANO, A. A. et al. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 45, p. 27244–27253, nov. 1995.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4927, p. 227–234, out. 1989.

SILVA, J. S. et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 175, n. 1, p. 169–174, jan. 1992.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 3, p. 539–545, set. 1991.

SILVA RIHO, F. C. et al. Surface charge of resident, elicited, and activated mouse

- peritoneal macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 41, n. 2, p. 143–149, 1987.
- TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: Tissue parasitism and endogenous IFN- γ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 851–866, 2000.
- TANOWITZ, H. B. Chaga's Disease. **Clin Microbiol Ver**, v. 5, n. 4, p. 400–419, 1992.
- TANOWITZ, H. B. et al. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). **Progress in cardiovascular diseases**, v. 51, n. 6, p. 524–539, 2009.
- TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 3, p. 1017–1022, mar. 1994.
- TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 550–554, 2001.
- TARLETON, R. L. et al. The Challenges of Chagas Disease— Grim Outlook or Glimmer of Hope? **PLOS Medicine**, v. 4, n. 12, p. e332, 27 dez. 2007.
- TARLETON, R. L. et al. Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 8–13, 2014.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85–104, 1998.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isozyme Variability in *Trypanosoma cruzi*, The Agent of Chagas' Disease: Genetical, Taxonomical, and Epidemiological Significance. **Evolution**, v. 42, n. 2, p. 277, 1988.
- TODESCHINI, A. R. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* catalyzes sialoside hydrolysis with retention of configuration. **Glycobiology**, v. 10, n. 2, p. 213–221, 2000.
- TODESCHINI, A. R. et al. Costimulation of Host T Lymphocytes by a Trypanosomal trans-Sialidase: Involvement of CD43 Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5192 LP – 5198, maio 2002a.
- TODESCHINI, A. R. et al. from *Trypanosoma cruzi* binds host T-lymphocytes in a lectin manner. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 48, p. 45962–45968, nov. 2002b.
- TREYNOR, T. P. et al. Computationally designed libraries of fluorescent proteins evaluated by preservation and diversity of function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 1, p. 48–53, 2007.
- TRIPATHI, P. et al. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 51, n. 3, p. 443–452, dez. 2007.
- TRUYENS, C.; CARLIER, Y. **Protective host response to *Trypanosoma cruzi* and its limitations**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- UNIVERSITARIA, C.; INTRODUCTION, I. **GLYCOBIOLOGY OF TRYPANOSOMA CRUZI ´ a Agusti By Rosa M. de Lederkremer and Rosal**. [s.l.: s.n.]. v. 62
- VARKI, A. Selectins and other mammalian sialic acid-binding lectins. **Current opinion in cell biology**, v. 4, n. 2, p. 257–266, abr. 1992.

- VARKI, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1023–1029, 2007.
- VARKI, A.; KORNFIELD, S. Historical Background and Overview. In: VARKI, A. et al. (Eds.). . Cold Spring Harbor (NY): [s.n.]. p. 1–18.
- VARKI, A.; SCHNAAR, R. L.; SCHAUER, R. Sialic acids and other nonulosonic acids. In: **Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition.** [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- VAZQUEZ-JIMENEZ, L. K. et al. Effect of 4-amino-3-nitrobenzoic acid on the expression level of the trans-sialidase gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 32, n. 2 (Supplementary), p. 825–829, mar. 2019.
- VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5177–5182, 1994.
- VIMR, E. R. et al. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 1, p. 132–153, 2004.
- VOIGT, C. A. et al. Computationally focusing the directed evolution of proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 84, n. SUPPL. 37, p. 58–63, 2001.
- WANG, D. et al. Globally profiling sialylation status of macrophages upon statin treatment. v. 25, n. 9, p. 1007–1015, 2015.
- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018.
- WOODS, R. J.; LORETTA, Y. **GLYCAN-SPECIFIC ANALYTICAL TOOLS** United States Of America, 2018.
- WOOLSEY, A. M. et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 17, p. 3611–3622, set. 2003.
- YOSHIDA, N. et al. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 57, n. 6, p. 1663–1667, jun. 1989.
- ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 203–213, 1996.
- ZINGALES, B. et al. Direct sialic acid transfer from a protein donor to glycolipids of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1–2, p. 135–144, 1987.
- ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.
- ZINGALES, B. et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.
- ZOU, Z. et al. Siglecs facilitate HIV-1 infection of macrophages through adhesion with

viral sialic acids. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24559, 2011.