



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROSIANE VALERIANO DA SILVA

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS
COM *Phytomonas serpens*, UM TRIPANOSSOMATÍDIO
FITOFLAGELADO, ATENUA A TROMBOCITOPENIA E A
LEUCOPENIA INDUZIDA PELA TRANS-SIALIDASE DE
*Trypanosoma cruzi***

Londrina
2011

ROSIANE VALERIANO DA SILVA

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS
COM *Phytomonas serpens*, UM TRIPANOSSOMATÍDIO
FITOFLAGELADO, ATENUA A TROMBOCITOPENIA E A
LEUCOPENIA INDUZIDA PELA TRANS-SIALIDASE DE
*Trypanosoma cruzi***

Defesa de Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Patologia Experimental

Orientador: Profo. Dr. Phileno Pinge Filho

Co-Orientadora: Profa. Dr. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586r Silva, Rosiane Valeriano da.
Resposta imunológica em camundongos imunizados com *Phytomonas serpens*, um tripanossomatídeo fitoflagelado, atenua a trombocitopenia e a leucopenia induzida pela trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi* / Rosiane Valeriano da Silva. – Londrina, 2011.
118 f. : il.

Orientador: Phileo Pinge Filho.
Co-orientador: Sueli Fumie Yamada Ogatta.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Chagas, Doença de. – Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 3. Protozoário – Teses. 4. Resposta imune – Teses. 5. Leucopenia – Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório – Teses. 7. Patologia experimental – Teses. I. Pinge Filho, Phileo. II. Ogatta, Sueli Fumie Yamada. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616.937.3

ROSIANE VALERIANO DA SILVA

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM
Phytomonas serpens, UM TRIPANOSSOMATÍDIO FITOFLAGELADO,
ATENUA A TROMBOCITOPENIA E A LEUCOPENIA INDUZIDA PELA
TRANS-SIALIDASE DE *Trypanosoma cruzi***

Defesa de Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como pré-requisito para obtenção do Título de Mestre em Patologia Experimental

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudio Romero Farias Marinho
Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de janeiro de 2011

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunopatologia Experimental do Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da UEL, Londrina, Paraná, com apoio financeiro da CAPES e Fundação Araucária (Processo 30661 2009).

DEDICO

Á Deus, pela presença constante em minha vida.
Aos meus pais Manoel (*in memorian*) e Maria, aos meus irmãos Roseli e Adriano, com
muito amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu infinito amor e misericórdia, pela graça de realizar este trabalho.

Ao meu amado pai Manoel Valeriano da Silva, pelos poucos anos em que passamos juntos, mas que foram de extrema importância para a formação do meu caráter, por todos os momentos de amor, carinho, paciência, e compreensão e principalmente por me despertar a vontade e curiosidade do saber.

A minha querida mãe Maria Guedes da Silva, pelo exemplo de força, coragem, determinação e sabedoria. Obrigada por todas as noites que passou em claro zelando por mim e principalmente por toda confiança em mim depositada.

Ao meu irmão Adriano, pela compreensão, carinho e confiança. Obrigada por acreditar em meu ideal.

A minha irmã, Roseli, pelo carinho, dedicação e incentivo.

A minha sobrinha Mariane por aguentar a todas as minhas pentelharias e por me ajudar a cuidar da “Ia”!

Ao meu avô Manoel Rodrigues de Oliveira, obrigada pelo seu carinho, compreensão e incentivo para ir em busca de meus objetivos. Sem sua ajuda nada seria possível.

Agradeço ao amor, carinho e confiança depositados em mim. Amo muito todos vocês!

Ao Professor Dr. Phileo Pinge Filho por todas as valiosas lições de competência, respeito, carinho, amizade, confiança e profissionalismo. Agradeço pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos. O meu respeito e admiração.

À melhor equipe do mundo Vera, Aparecida, Maria Isabel, Daniel, Lauana, Nágela, Maísa, Josiane, Isadora por momentos de aprendizagem e descontração.

Em especial meus sinceros agradecimentos á Aparecida Malvezi e á Vera Tatakihara, sem vocês nada seria possível.

Agradeço também a todos os que passaram pelo nosso laboratório e fizeram parte desta equipe maravilhosa ou melhor ainda fazem parte Carolina Panis, Vanessa, Cauê, Mariana, Daniela e Patrícia.

À Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada- Ogatta e à Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni por abrirem as portas de seu laboratório e compartilharem de seu conhecimento.

Aos amigos do NIP5 Priscila, Igor, Taísa, Eloar, Felipe, Suelen, Jussevania, Alexandre, Eliandro, Carline, Jackson, César, Daniela e todos os outros que aqui não são citados, mas guardo no coração a imensa amizade!

Não podendo me esquecer do querido técnico Ediel, obrigada por me ensinar e ajudar todas as vezes que lhe pedi.

Muito obrigada aos funcionários do Departamento de Ciências Patológicas, em especial ao Zui pela alegria e disposição em me ajudar sempre que precisei.

As minhas amigas Lilian e Alane por todos os momentos que juntas passamos, pelo carinho, dedicação e motivação.

A minha adorável amiga Professora Ms. Daniele de Oliveira por ter me mostrado o fascinante mundo da ciência e colocar em mim o desejo de ir em busca de meus ideais.

Ao meu anjo da guarda Edna por todos os momentos me acolher com suas orações.

Ao meu namorado Rogério pelo amor, confiança, compreensão, incentivo e cumplicidade para trilhar novos caminhos em busca de um ideal.

Aos Docentes do Curso pelo conhecimento proporcionado.

Aos colegas de turma por momentos de felicidade e companheirismo.

A todos os funcionários do interlaboratório, Sr. Adernaldo, D. Irene, Mary, Classi, Iara e Val, agradeço pelo auxílio na manutenção dos animais do biotério e materias.

Meus sinceros agradecimentos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos camundongos que com suas vidas, contribuíram para a realização dos experimentos.

A todos que direta e indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

*Eu sei que os sonhos são pra sempre
Eu sei aqui no coração
Eu vou ser mais do que eu sou
Para cumprir as promessas que eu fiz
Porque eu sei que é assim
Que os meus sonhos dependem de mim*

*Eu vou tentar
Sempre
E acreditar que sou capaz
De levantar uma vez mais*

*Eu vou seguir
Sempre
Saber que ao menos eu tentei
E vou tentar mais uma vez
Eu vou seguir*

*Não sei se os dias são pra sempre
Eu vou correndo atrás
Aprendi que nunca é demais
Vale a pena insistir
Minha guerra é encontrar minha paz*

SILVA, Rosiane Valeriano da. **Resposta imunológica em camundongos imunizados com *Phytomonas serpens*, um tripanossomatídeo fitoflagelado, atenua a trombocitopenia e a leucopenia induzida pela trans-sialidase de *Trypanosoma cruzi*.** 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2011.

RESUMO

A presença de componentes antigênicos comuns entre tripanossomatídeos parasitas de insetos e plantas, e *Trypanosoma cruzi* tem sido reforçada através de diversos estudos sobre a atividade protetora de suspensões ou extratos de flagelados monogenéticos. Camundongos inoculados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, apresentaram intensa trombocitopenia, anemia, leucopenia com neutropenia seguida por neutrofilia e eosinofilia. Alguns autores sugeriram que a anemia e a trombocitopenia observadas na fase aguda da infecção está associada com hipoplasia medular e consequente pancitopenia. O parasito *Trypanosoma cruzi* expressa Trans-sialidase, uma enzima capaz de mobilizar resíduos sialil na superfície celular. Nós avaliamos a capacidade de imunização com suspensões vivas de *Phytomonas serpens* (15T) um tripanossomatídeo contra *Trypanosoma cruzi* (Y) e a ação da Trans-sialidase. Camundongos C57BL/6 receberam pela via oral 4 inóculos de *Phytomonas serpens* (2x10⁸ protozoários/inóculo) com intervalos de 7 dias. Uma semana após o último inóculo, os animais foram infectados pela via intraperitoneal por *Trypanosoma cruzi* (105 formas tripomastigotas sanguícolas), após 12 dias da infecção os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca para análise hematológica. Os animais também receberam um único inóculo de Trans-sialidase recombinante (50µg/ animal) pela via intraperitoneal e após 24 horas do inóculo os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca, e um terceiro grupo de animais não imunizados receberam um inóculo por via intraperitoneal de Trans-sialidase recombinantes (50µg/animal) e anticorpo monoclonal anti-Trans-sialidase ou anticorpo monoclonal anti-*Phytomonas serpens* e após 24 horas do inóculo os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca. Nós constatamos que a imunização prévia destes animais protege-os contra a depleção das plaquetas e leucopenia que é observado durante a fase aguda da infecção. Também constatamos que a transferência passiva de anticorpos anti-Trans-sialidase ou anti-*Phytomonas serpens* é capaz de diminuir a ação *in vivo* da Trans-sialidase sobre as plaquetas de camundongos saudáveis.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Leucopenia. *Phytomonas serpens*. Trombocitopenia. Trans-sialidase.

SILVA, Rosiane Valeriano da. **Immune response in mice immunized with *Phytomonas serpens*, one fitoflagelado tripanossomatídeo, mice attenuates induced thrombocytopenia and trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* leukopenia.** 2011. 118 p. Dissertation (Master's Experimental Patotology) – Londrina State University, Londrina. 2011.

ABSTRACT

The presence of common antigenic components among trypanosomatids parasites of insects and plants, and *Trypanosoma cruzi* has been reinforced by several studies on the protective activity of suspensions or extracts of monogenetic flagellates. Mice inoculated with different strains of *Trypanosoma cruzi*, showed severe thrombocytopenia, anemia, leukopenia and neutropenia followed by neutrophilia and eosinophilia. Some authors have suggested that anemia and thrombocytopenia during the acute infection is associated with medullary hiploplasia and consequent pancytopenia. The parasite *Trypanosoma cruzi* expresses Trans-sialidase, an enzyme capable of mobilizing sialyl residues on cell surface. We evaluated the ability of immunization with live suspensions of a trypanosomatid, *Phytomonas serpens*, (15T) against *Trypanosoma cruzi* (Y) and the action of the Trans-sialidase on *Trypanosoma cruzi*. C57BL / 6 mice were orally inoculated with 4 *Phytomonas serpens* (2x10⁸ protozoa / inoculum) with a gap of 7 days. A week after the last inoculation, animals were intraperitoneally infected with *Trypanosoma cruzi* (10⁵ blood trypanomastigotes forms), after 12 days of infection the animals were anesthetized and blood was collected by cardiac puncture for hematological analysis. The animals also received a single inoculum of Trans-sialidase recombinant (50µg / animal) intraperitoneally and 24 hours after inoculation the animals were anesthetized and blood was collected by cardiac puncture, and a third group of not immunized animals received an intraperitoneal inoculum route of Trans-sialidase recombinant (50µg/animal) plus monoclonal anti-Trans-sialidase or monoclonal anti-*Phytomonas serpens* and 24 hours after inoculation the animals were anesthetized and blood was collected by cardiac puncture. We found that prior immunization protects these animals against the depletion of platelets and leukopenia observed during the acute phase of infection. And we also found that passive transfer of anti-Trans-sialidase or anti-*Phytomonas serpens* is able to decrease the *in vivo* action of Trans-sialidase on the platelets of healthy mice.

Keywords: Chagas' disease. Leukopenia. *Phytomonas serpens*. Thrombocytopenia. Trans-sialidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas evolutivas dos tripanossomatídios	18
Figura 2. Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Phytomonas serpens</i>	20
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 4. Reação de transferência de ácido siálico do hospedeiro para o parasito pela ação da enzima trans-sialidase.....	38
Figura 5. Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina	42
Figura 6. Isoformas da NO sintase	43

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Características principais dos protozoários tripanossomatídeos.....	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>T.cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>P. serpens</i>	<i>Phytomonas serpens</i>
DC	Doença de Chagas
TM	Tripomastigota Metacíclicos
TCC	Tripomastigotas de Cultivo Celular
PTK	Proteína Tirosina kinase
PLC	Fosfolipase
IP3	Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato
AMPc	AMP cíclico
Opb	Oligopeptidase B
TS	Trans-sialidase
VP	Vacúolo Parasitóforo
Akt	Serina/ Treonina kinase
PI-3k	Fosfatidilinositol 3 kinase
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador Beta
TLRs	Receptores do Tipo Toll
TIR	Domínio de Homologia Toll/Receptor Interleucina 1
PPRs	Receptores de Reconhecimento de Padrão
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
CB	Citocalasinas B
CD	Citocalasinas D
NO	Óxido Nítrico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>T. rangeli</i>	<i>Trypanosoma rangeli</i>
NO₂	Nitrito
NO₃	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NADPH	Nicotinamida- Adenina- Dinucleotídeo- Fosfato- Hidrogênio
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva

eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
O₂	Superóxido
ONOO-	Peroxinitrito
Hb	Hemoglobina
IFN-γ	Interferon Gama
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IFN-α	Interferon Alfa
MIP-1α	Proteína Inflamatória do Macrófago 1 Alfa
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Familia Trypanosomatidae</i>	16
1.2	O Gênero <i>Phytomonas spp</i>	18
1.3	<i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas	22
1.4	<i>Phytomonas serpens</i> versus <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
1.5	Proteases	36
1.6	Trans-sialidase	37
1.7	Alterações hematológicas na infecção murina por <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
1.7.1	Papel da TS	39
1.7.2	Papel do óxido nítrico.....	41
2	OBJETIVOS	47
2.1	Objetivo geral	48
2.2	Objetivos específicos	48
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
4	MANUSCRITO	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família *Trypanosomatidae*

A família *Trypanosomatidae* da ordem Kinetoplastida é constituída por protozoários flagelados que apresenta uma estrutura denominada cinetoplasto, uma massa de DNA circular localizada dentro de uma grande mitocôndria que contém numerosas cópias do genoma mitocondrial. Essas cópias estão compactadas em mini-círculos e maxi-círculos, constituindo cerca de 10-30% do DNA do protozoário (MCGHEE & COSGROVE, 1980; VICKERMAN, 1994). A presença de organelas especiais do tipo peroxissoma (microcorpos), conhecidas como glicossomas e microtúbulos subpeliculares, são também estruturas características destes protozoários (DE SOUZA, 2000).

Os tripanossomatídeos são cosmopolitas com habilidades para parasitar uma grande diversidade de hospedeiros tais como animais (inclusive o homem), plantas e protistas (DOLLET, 1984; CAMARGO, 1999). A ordem Kinetoplastida é composta por protozoários uniflagelados divididos em nove gêneros, definidos por diferentes estágios morfológicos e pelo tipo de hospedeiro que parasitam. *Leptomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, e *Rhyncoïdomonas* compreendem os gêneros que parasitam exclusivamente insetos. O gênero *Phytomonas* parasita insetos e plantas e os gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum* apresentam ciclo de vida complexo, alternando o parasitismo entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (MCGHEE & COSGROVE, 1980; VICKERMAN, 1994). Os gêneros heteroxênicos compreendem espécies como, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), *Trypanosoma brucei* e várias espécies de *Leishmania*, agentes responsáveis

pela Doença de Chagas, Doença do Sono Africana e Leishmaniose, respectivamente (Tabela 1).

A morfologia de tripanossomatídeos é fundamentada por meio da observação de espécimes fixados com metanol e corados com Giemsa, onde se observa claramente o núcleo, o cinetoplasto e o flagelo.

Gêneros	Formas Evolutivas	Ciclo de Vida	Hospedeiros Principais
<i>Crithidia</i>	coanomastigota	monoxênico	Insetos
<i>Wallaceina</i>	endomastigota	monoxênico	Insetos
<i>Leptomonas</i>	Promastigota	monoxênico	Insetos
<i>Herpetomonas</i>	pro-, para- e opistomastigota	monoxênico	Insetos
<i>Phytomonas</i>	Promastigota	heteroxênico	insetos e plantas
<i>Leishmania</i>	amastigota (vertebrado) e promastigota (inseto)	heteroxênico	vertebrados e insetos ("sand flies": Diptera: Phlebotominae)
<i>Blastocrithidia</i>	Epimastigota	monoxênico	Insetos
<i>Trypanosoma</i>	amastigota (vertebrado: em células), tripomastigota (vertebrado: no sangue) e epimastigota (inseto)	heteroxênico	vertebrados e insetos (América: percevejo "barbeiro" [Hemiptera - Triatominae]. Africa: moscas tsé-tsé - <i>Glossina</i> spp.)
<i>Endotrypanum</i>	promastigota (inseto) e epi-/tripomastigota	heteroxênico	insetos e no interior de hemácias de preguiças

Tabela 1. Características principais dos protozoários tripanossomatídeos. (Fonte: <http://lbcm.ioc.fiocruz.br/tripanosomatidios.htm>).

Com base na forma geral da célula (esférica, piriforme, alongada), a posição relativa entre o núcleo e o cinetoplasto (anterior, lateral e posterior) e na maneira da saída do flagelo da bolsa flagelar (central ou lateral), definem-se as seguintes formas evolutivas para os tripanossomatídeos: amastigotas, esferomastigotas,

coanomastigota, opistomastigotas, epimastigotas e tripomastigota (Figura 1) (VICKERMAN & PRESTON, 1976; DE SOUZA, 2000).

1.2 O Gênero *Phytomonas*

A descoberta de protozoários da família *Trypanosomatidae* parasitando vegetais ocorreu em 1909, na mesma época em que Carlos Chagas publicou no Brasil suas importantes contribuições relativas à *Trypanosoma cruzi* e a tripanosomomíase americana (Doença de Chagas) (JANKEVICIUS et al., 1989).

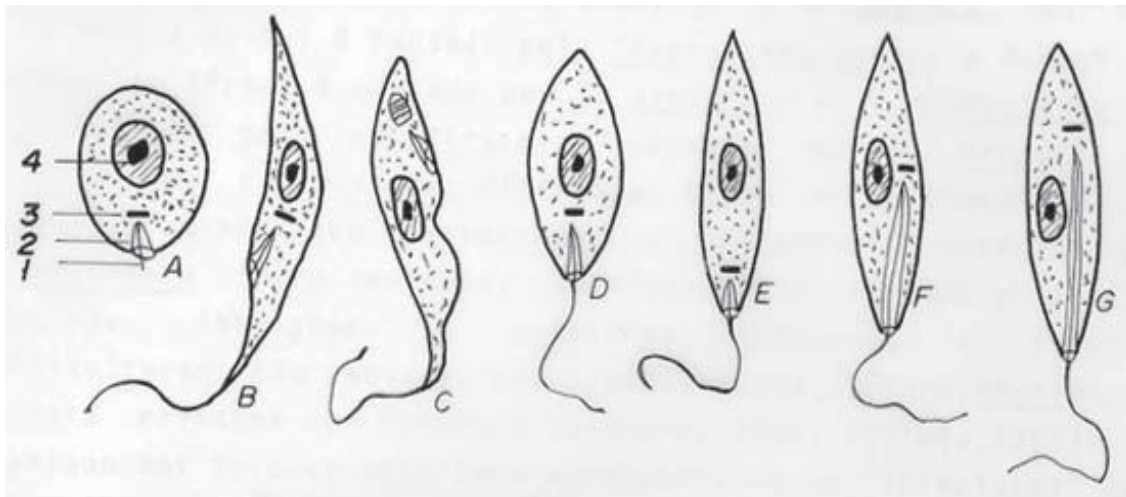


Figura 1. Formas evolutivas dos tripanossomatídeos: 1- Flagelo; 2- Bolsa flagelar; 3- cinetoplasto; 4- núcleo. (A) amastigota; (B) epimastigota; (C) tripomastigota; (D) coanomastigota; (E) promastigota; (F) paramastigota e (G) opimastigota. Fonte: <http://lbcm.ioc.fiocruz.br/tripanosomatidios.htm>.

Somente em 1957 foi descrito por Gibbs na África, um tripanossomatídeo parasito exclusivo dos frutos do tomate (*Lycopersicon sculentum*) denominado *Leptomonas serpens*. O nome *Phytomonas* foi introduzido para designar tripanossomatídeos originalmente encontrados no látex de *Euphorbiaceae* e mais

tarde em uma ampla variedade de espécies de plantas. A presença de tripanossomatídeos em plantas de interesse econômico tem atraído à atenção de vários grupos de pesquisa e o gênero *Phytomonas* é o tripanossomatídeo de planta mais estudado (CAMARGO, 1999).

Phytomonas spp. são encontrados em plantas de grande importância econômica, incluindo caju, café, mandioca, coco, dendê e frutos comestíveis, como tomate, laranja, goiaba, uva, carambola entre outros. Eles também atuam como parasitas de plantas lactíferas, aparentemente sem causar doenças (DOLLET, 1984; CAMARGO, 1999). As formas de *Phytomonas* encontradas nos tubos lactíferos são facilmente cultivadas “in vitro”. Os tripanossomatídeos que parasitam exclusivamente frutos não se disseminam para outras partes da planta e multiplicam-se rapidamente em meio de cultura (DOLLET, 1984).

Entretanto, o gênero *Phytomonas* pode ainda abrigar grupos de parasitas do floema que estão relacionados a alguns tipos de síndromes patológicas vegetais e constituem o grupo mais exigente quanto ao cultivo “in vitro” necessitando de meios de cultura de células de insetos acrescentado de soro bovino fetal.

JANKEVICIUS e colaboradores (1989) determinaram o ciclo biológico de *Phytomonas serpens* (*P. serpens*) utilizando-se de insetos (*Phthia picta* e *Nezara viridula*) e cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) mantido em laboratório. Foi mostrado que os insetos infectaram-se através da via digestiva e o tripanossomatídeo é transmitido, para o tomate, pela saliva no momento da picada (Figura 2).

A heterogeneidade genética de tripanossomatídeos de plantas foi descrito por MULLER e colaboradores (1997) ao estudarem as isoenzimas e o DNA do cinetoplasto. Utilizando a técnica de amplificação de DNA (PCR), SERRANO e colaboradores (1999) obtiveram para 48 isolados de plantas e insetos previamente classificados como pertencentes ao gênero *Phytomonas*, fragmentos de 100 pb que hibridaram com sondas específicas para *Phytomonas*. Este método não mostrou reação com nenhum outro gênero da família, revelando ser eficaz na detecção de espécies de *Phytomonas* do fruto, látex ou do floema de várias plantas hospedeiras, bem como de glândula salivar ou do tubo digestivo de algumas espécies de insetos.

A caracterização de componentes de superfície de *Phytomonas sp* revelou que este grupo de protozoários pode ser diferenciado de *Herpetomonas samuelpeessoai* e *Crithidia fasciculata*, pela composição de carboidratos de superfície (ABREU FILHO et al., 2001).

Em adição, diferentes grupos de pesquisadores têm estudado algumas peculiaridades do metabolismo de *Phytomonas* (CAMARGO, 1999; SANCHEZ-MORENO et al., 1992; GONZÁLEZ-HALPHEN et al., 2004). Um destes grupos mostrou que formas de cultura de *Phytomonas spp.* isoladas de *Euphorbia* habitam tecidos ricos em carboidratos e apresentam a ausência do citocromo c na cadeia respiratória mitocondrial (SANCHEZ-MORENO et al., 1998). Estas formas também excretam hidrolases que são eficientes para degradar polissacarídeos e monossacarídeos com alta taxa de produção de ATP pela via glicolítica (GONZÁLEZ-HALPHEN et al., 2004). Pouco é conhecido sobre o metabolismo de *Phytomonas* no inseto vetor, mas há indicações que os aminoácidos constituem a principal fonte de energia deste gênero (SANCHEZ-MORENO et al., 1992; GONZÁLEZ-HALPHEN et al., 2004).

1.3 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

Trypanosoma cruzi é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae* e foi descrito por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1907 em animais silvestres e domésticos. Dois anos depois, Carlos Chagas descreveu o primeiro caso humano da doença causada por *T. cruzi*, a Tripanossomíase americana ou Doença de Chagas (DC) (CHAGAS, 1909).

A DC constitui uma doença típica das regiões tropical e subtropical da América Latina, estendendo-se até a região sudeste dos Estados Unidos da América (DIAS, 2006). A doença atinge 10 milhões de pessoas de 18 países da América Latina, com cerca de 100 milhões de indivíduos expostos ao risco de novas infecções (WHO, 2004). A cada ano acontecem aproximadamente 21 mil mortes e incidência de 300 mil novos casos, o que torna essa uma das doenças parasitárias mais importantes das Américas (RASSI et al., 2010).

No Brasil aproximadamente 1.900, 000 pessoas se encontram infectadas, e cerca de 12% da população vivem em áreas de risco de contrair a doença (RASSI, et al, 2010). Desse modo, a DC deve ser encarada como uma das prioridades de programas de saúde pública (MONCAYO, 2003; DIAS, 2006). Registros oficiais de óbitos indicam que no Brasil ocorram aproximadamente seis mil mortes de pacientes chagásicos crônicos por ano (CHAPADEIRO, 1999) e redução aproximadamente de nove anos na expectativa de vida de portadores crônicos (BLITZMAN, 2007).

A infecção caracteriza-se pela existência de uma fase aguda, na qual a parasitemia é comumente observada seguida por uma fase crônica, onde a carga parasitária é controlada sem que haja completa eliminação dos parasitos. No homem a fase aguda da infecção é pouco sintomática. Na fase crônica, 30% dos

indivíduos infectados desenvolvem patologias que podem se manifestar por insuficiência cardíaca, distúrbios do ritmo cardíaco, ou dilatações do trato digestivo (ANDRADE, 1999).

Muitas vezes a fase aguda da infecção não é percebida pelo paciente, 95% dos casos são assintomáticos. Nos restantes, casos sintomáticos, as manifestações clínicas agudas da DC são febre, mal estar, dores musculares e juntas, sonolência, cólicas e diarreia, edema, distúrbios respiratórios e cianose. Considerando que, 5% dos pacientes com sintomas agudos morrem, pode ser estimada que a mortalidade nesta fase da infecção é entre 1:2500 e 1:5000 (TEIXEIRA et al., 2006). Após a fase aguda, geralmente benigna e inaparente, segue-se uma fase clínica conhecida como “indeterminada” ou “inaparente”, na qual associam-se ausência de sintomatologia clínica com sorologia positiva. Após vinte a trinta anos, cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, com diferentes formas clínicas: cardíaca, digestiva ou neurológica (ARAÚJO-JORGE, 2000).

Curiosamente, dois terços dos 18 milhões de pessoas abrigam a infecção crônica por *T. cruzi* e não expõem qualquer manifestação clínica da DC.

A forma clínica indeterminada, apesar do seu bom prognóstico em pelo menos um médio prazo (5-10 anos), adquiriu uma importância crescente, devido ao significado controverso da anormalidade de alguns testes e as lesões focais do miocárdio encontradas em muitos pacientes (PRATA, 2001).

Após 10 a 30 anos de infecção, ocorrem os sintomas mais severos da doença onde se observa comprometimento associado do aparelho digestório (10% dos casos) e, principalmente, do tecido cardíaco (13% dos casos), que contribui substancialmente para as altas taxas de morbidade e mortalidade por DC

(MAGUIRRE et al., 1987; WANDERLEY et al., 1994; DIAS, 1999), caracterizando a forma crônica da doença.

A forma crônica cardíaca é evidenciada pela cardiomiopatia inflamatória de evolução fatal, acompanhada clinicamente por arritmias, fenômenos tromboembólicos, insuficiência cardíaca congestiva e cardiomegalia. Ocorrem lesões no sistema de condução cardíaco, alterações vasculares e lesão apical que contribuem para a destruição progressiva do miocárdio (ANDRADE, 2000).

O prognóstico da cardiopatia chagásica crônica depende do grau de comprometimento cardíaco, da cardiomegalia e do grau de insuficiência cardíaca, podendo ocorrer óbito por falência cardíaca ou morte súbita por bloqueio na condução do estímulo átrio-ventricular (BLITZMAN, 2007), além da redução da expectativa de vida para aproximadamente 60 anos de idade (MAGUIRRE et al., 1987).

A resposta imunológica gerada contra o parasito também promove lesões teciduais, associadas ao processo auto-imune de destruição do tecido cardíaco ou à produção de mediadores inflamatórios contra o parasito e seus antígenos teciduais (GIRONES & FRESNO, 2003).

No acometimento crônico do trato digestório, ocorrem alterações (megaesôfago) e constipação (megacólon), decorrentes do comprometimento do sistema nervoso entérico, hipertrofia e inflamação teciduais (ANDRADE, 2000).

Inicialmente, a infecção por *T. cruzi* era transmitida na natureza através do ciclo silvestre entre triatomíneos e mamíferos (TEIXEIRA et al., 2001), mas devido à ocupação predatória do ambiente silvestre pelo homem transformou-se em uma antropozoonose, onde o homem e os animais domésticos constituíram o ciclo doméstico e peridomiciliar do parasito (FORATINI, 1980).

Formas menos comuns de transmissão são: transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, acidentes de laboratório, o aleitamento materno e contaminação oral (PUNUKOLLU et al., 2007).

O ciclo de vida de *T. cruzi* é do tipo heteroxênico (Figura 3), passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado e extracelular, no hospedeiro invertebrado que pertence à classe Hemiptera, família Reduviidae e subfamília *Triatominae* (DE SOUZA, 1984). O protozoário apresenta três formas evolutivas estáveis às quais são identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984). Epimastigotas: forma alongada, replicativa no inseto vetor, com cinetoplasto anterior ao núcleo; o flagelo emerge da bolsa flagelar formando uma pequena membrana ondulante. Tripomastigota: forma alongada, infectante e não replicativa encontrada no sangue do hospedeiro vertebrado (tripomastigota sanguíneo) e na porção final do trato intestinal do inseto vetor (tripomastigota metacíclico). Apresenta o cinetoplasto posterior ao núcleo e o flagelo que emerge da bolsa flagelar percorre todo o corpo, formando uma extensa membrana ondulante, que se torna livre na porção anterior da célula. Amastigota: forma arredondada, replicativa no interior das células do hospedeiro vertebrado, com flagelo curto que não se exterioriza (DE SOUZA, 1984, 2000; TYLER & ENGMAN, 2001).

Nos mamíferos, o ciclo evolutivo de *T. cruzi* inicia-se com a penetração de tripomastigotas metacíclicos (TM) eliminados nas fezes e urina do inseto vetor, através da pele lesada ou mucosa (BRENER, 1987; TEIXEIRA, 1987). A forma tripomastigota circula na corrente sanguínea e invade as células hospedeiras e, inicialmente, aloja-se no interior de um vacúolo endocítico, o vacúolo parasitóforo

(CARVALHO & DE SOUZA, 1989). A exposição das formas tripomastigotas a este ambiente ácido é necessária à secreção e atividade da proteína TcTox, atuante na formação de poros na membrana vacuolar e, conseqüentemente, no escape para o citoplasma. O meio ácido parece, também, ter papel importante no início da diferenciação de tripomastigotas em amastigotas. Esse processo se inicia no vacúolo e termina no citoplasma (TANOWITZ et al., 1975; KIRCHHOFF, 1996; BURLEIGH & WOOLSEY, 2002). Após escapar do vacúolo, *T. cruzi* se diferencia na forma amastigota e permanece livre no citoplasma da célula hospedeira em estado quiescente por algumas horas e inicia, posteriormente, seu processo de replicação por fissão binária (revisto por SIBLEY et al., 2000). Em seguida, as formas amastigotas diferenciam-se, novamente, em tripomastigotas.

A intensa movimentação gerada pelos parasitos no interior da célula hospedeira promove sua ruptura e, conseqüentemente, a liberação dos tripomastigotas no meio extracelular tornando-os capazes de infectar novas células (BRENER, 1973; SOUZA, 2000). A ruptura da célula parasitada determina reação inflamatória focal, caracterizada pela presença de neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos e células mononucleares, além de congestão e edema (PRATA, 1994; ANDRADE, 2000).

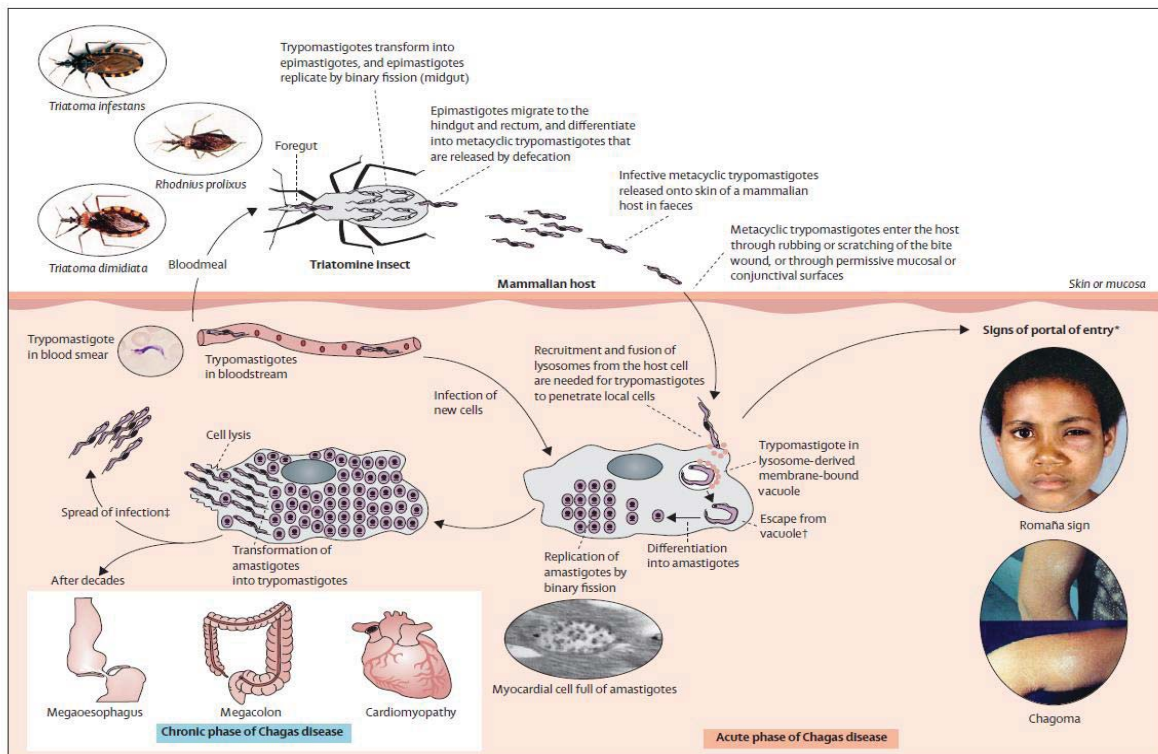


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Fonte: RASSI et al., 2010).

Assim sendo, constata-se que a invasão da célula do hospedeiro é um evento crítico no estabelecimento da infecção por *T. cruzi* (revisado por YOSHIDA, 2006). As formas TM são capazes de parasitar diferentes tipos celulares como fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, fibroblastos, macrófagos e células gliais (ANDRADE, 2000). Recentemente, foi mostrado que *T. cruzi* pode infectar células L929 sem núcleo, ou seja, a infecção ocorre na ausência de transcrição gênica cromossomal e/ou nucleolar e do processamento do RNA (COIMBRA *et al.*, 2007).

T. cruzi pode utilizar diferentes mecanismos de invasão, relacionados com receptores e ligantes disponíveis tanto no parasito quanto na superfície de células-alvo específico. O processo de invasão inicia-se com a adesão do parasito à superfície celular, entretanto, o grau de adesão varia de acordo com a população do parasito, com a forma evolutiva e com a célula-alvo (ARAÚJO-JORGE et al., 1992).

Diferentes tipos de carboidratos, presentes nas glicoproteínas e nos glicolipídeos da superfície do parasito e da célula hospedeira, parecem participar desse processo de adesão (MEIRELLES et al., 1999; CALVET et al., 2004). Glicoproteínas de superfície de *T. cruzi* são importantes para mobilização do cálcio intracelular, tanto do parasito quanto da célula hospedeira, sendo este fenômeno de grande importância para o processo de interiorização do parasito.

A grande maioria dos estudos realizados na tentativa de elucidar os mecanismos utilizados pelo protozoário *T. cruzi* utilizaram formas TM geradas em meio líquido ou a partir do cultivo celular (TCC) como sócias das formas encontradas no inseto vetor e no sangue, respectivamente. A análise dos dados da literatura permite concluir que durante a entrada na célula do hospedeiro as formas TM e TCC utilizam diferentes tipos de moléculas que induzem a transdução de sinal e mobilização de Ca^{2+} .

De acordo com SCHENKMAN e colaboradores (1991) a adesão dos TCC à superfície celular, mediada por receptores, está restrita a certas regiões da membrana. RUIZ e colaboradores (1998) descrevem que a capacidade dos tripomastigotas, de diferentes isolados de *T. cruzi*, de invadir as células hospedeiras é determinada pela expressão diferencial de glicoproteínas de superfície que exibem atividade sinalizadora de cálcio distinta. Três moléculas de superfície com atividade indutora de Ca^{2+} já foram identificadas, são elas: a gp82, gp30 e gp35/50. O papel dessas moléculas durante o processo de invasão celular foi deduzido por meio de experimentos no qual a internalização de TM foi inibida por meio da utilização de glicoproteínas recombinantes ou com o uso de anticorpos monoclonais (RAMIREZ et al., 1993; RUIZ et al., 1993; CORTEZ et al., 2003).

Em adição, a análise de moléculas de superfície dos parasitos possibilitou sua divisão em dois grupos distintos quanto à capacidade de invasão, *in vitro*, de células de mamíferos (YOSHIDA, 2006; EICKHOFF et al., 2010). As populações que apresentam maior capacidade infectante não possuem as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50. Tripomastigotas dos isolados mais infectivos, como o clone CL Brener, se liga à superfície da célula hospedeira através de gp82 e induzem a ativação de PTK (proteína tirosina kinase). Essa sinalização também envolve a ativação da fosfolipase (PLC), a geração de IP3 (fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato) e, conseqüentemente, a mobilização de Ca²⁺ dos seus estoques intracelulares, provavelmente retículo endoplasmático (YOSHIDA et al., 2000).

Por outro lado, em isolados de menor capacidade infectante, como a cepa G, a ligação à superfície celular ocorre principalmente através de gp35/50, que promove uma cascata de sinalização menos eficiente. Nesses isolados, a cascata de sinalização é independente de PTK e PLC e provavelmente dependente de AMPc (AMP cíclico). O Ca²⁺ necessário para invasão parece ser liberado para o citosol a partir de vacúolos contendo um sistema de troca iônica Ca²⁺/H⁺, também chamados acidocalcissomas (revisado por YOSHIDA, 2006).

O envolvimento das moléculas gp82, gp30 e gp35/50 na internalização de TM tem sido caracterizado em células de mamíferos que são fagócitos não profissionais. Experimentos com diferentes isolados de *T. cruzi* mostraram que a taxa de infecção de macrófagos por TM correlaciona com aquela encontrada em células HeLa.

Diversas moléculas de TCC, incluindo a trans-sialidase (TS) e a gp85 participam de maneira importante na invasão de células do hospedeiro (revisado por ALVES & COLLI, 2007).

Segundo ANDREWS (1995) a elevação dos níveis intracelulares de cálcio, na célula hospedeira, promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito seguido por sua fusão com a membrana e formação do vacúolo parasitóforo. Os lisossomos são deslocados por uma proteína motora associada aos microtúbulos, a cinesina (TARDIEUX et al., 1992; RODRÍGUEZ et al., 1996). Além disso, o processo de invasão é facilitado pela ruptura de microfilamentos de actina (TARDIEUX et al., 1992). A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} promove a fusão dos lisossomos com o plasmalema. A proteína sinaptotagmina VII, membro da família sinaptotagmina, está presente na superfície dos lisossomos de diferentes tipos celulares e possui um domínio de ligação ao Ca^{2+} , regulando esse processo (CALER et al. 2001; YOSHIDA, 2006). Outras moléculas de superfície do parasito também participam do processo de invasão celular. Oligopeptidase B (Opb), uma serina endopeptidase expressa pelas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, é capaz de ativar uma cascata de sinalização de Ca^{2+} dependente de PLC e IP3 (BURLEIGH & ANDREWS, 1995; RODRÍGUEZ et al., 1995). A cruzipaina, uma cisteína proteinase expressa em todas as formas do ciclo de vida de *T. cruzi* (PAIVA et al., 1998), também ativa cascatas de sinalização mobilizadoras de Ca^{2+} , aumentando assim a eficácia do processo de invasão celular. Já a trans-sialidase (TS) transfere ácidos siálicos $\alpha(2,3)$ -ligados de glicoproteínas e glicolipídios da superfície da célula hospedeira para a superfície do parasito (SCHENKMAN & MORTARA, 1992). A sinalização celular é importante para o início do processo de adesão e formação de vacúolos parasitóforos (VP) eficientes. A presença do ácido siálico parece ser fundamental para correta justaposição das membranas do vacúolo nascente e dos tripomastigotas, promovendo a vedação do vacúolo e assim impedindo que *T. cruzi* escape durante o processo de internalização (LEY et al. 1990; HALL et al. 1992;

LOPEZ et al. 2002). Em 2006, Rubin-de-Celis e colaboradores, mostraram que o aumento na expressão de TS em TCC é responsável pela saída precoce dessas formas infectantes do VP para o citoplasma e subsequente diferenciação para formas amastigotas.

O tratamento de formas amastigotas com forskolina um ativador da adenilato ciclase aumentou a infectividade tanto do isolado G como do isolado CL em células HeLa, e o tratamento dessas formas com genisteína reduziu a infecção cerca de 45% a invasão do isolado G mas não do isolado CL em células HeLa, indicando a participação diferencial da proteína tirosina kinase durante a invasão dos diferentes isolados de *T. cruzi* (FERNANDES & MORTARA, 2006).

Fosfatidilinositol 3 kinase (PI-3 Kinase) e Akt (serina/treonina kinase) também são importantes reguladores do processo de invasão de *T. cruzi* em células não fagocíticas profissionais (WILKOWSKY et al. 2001). As PI-3K regulam o processo de tráfico de membranas, fusão de endossomas e rearranjo do citoesqueleto (DOWNWARD, 2004). Esse processo de sinalização provavelmente modula a invasão mediada por lisossomas ou outro associado à actina (PROCÓPIO et al., 1999). Além de participar no processo de invasão, a via de sinalização PI3K/Akt também estimula mecanismos pró-sobrevivência nas células parasitadas (CHUENKOVA et al., 2001).

Outra via de sinalização importante para invasão de *T. cruzi* é a que envolve o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β). TGF- β é uma citocina que participa de inúmeros eventos celulares como a produção de matriz extracelular, regulação da miogênese, resposta imune, angiogênese e embriogênese. Experimentos com células epiteliais de pulmão deficientes nos receptores para TGF- β mostraram que *T. cruzi* é incapaz de infectar essas células (MING et al. 1995). Também foi mostrado que o

bloqueio farmacológico de TGF- β com o composto SB-431542 pode ser uma nova ferramenta no controle da infecção de cardiomiócitos por *T. cruzi* (WAGHABI, et al., 2007).

Moléculas de superfície do parasito são reconhecidas por um tipo específico de receptor, os receptores do tipo Toll (TLRs) presentes nas células do hospedeiro. Os TLRs são receptores transmembrana do tipo 1 com domínio extracelular com repetições de leucina e uma cauda intracelular carboxi-terminal que contém uma região conservada denominada domínio de homologia Toll/receptor interleucina 1 (TIR). O domínio extracelular é responsável pelo reconhecimento do ligante e pelo processo de dimerização dos receptores, fundamental para sua ativação (WYLLIE et al., 2000). Até o momento 11 TLRs humanos e 13 TLRs murinos foram descobertos nas células de mamíferos (AKIRA et al., 2006). Esses receptores atuam na resposta imune inata e são parte de um grupo específico de receptores denominados receptores de reconhecimento de padrão (PPRs). Os PPRs reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Um PAMP é uma molécula altamente conservada que é expressa por uma classe de microrganismos e não é expressa pelas células hospedeiras (CAMPOS & GAZZINELLI, 2004; GAZZINELLI & DENKERS, 2006).

A invasão das células pelas formas tripomastigotas envolvem o reconhecimento inato do parasito por meio de TLR2, TLR6 e TLR4 (GAZZINELLI & DENKERS, 2006), receptores NOD-like, helicases RIG-like (MEYLAN, TSCHOPP, KARIN, 2006; SILVA et al., 2010) e receptores de manose (KAHN et al., 1996; MEIRELLES et al., 1999) que detectam a infecção e sinalizam entre a resposta imune inata e adaptativa (SABROE et al., 2008).

Uma nova estratégia de invasão celular de *T. cruzi* foi apresentada por FERNANDES e colaboradores (2007). Esses autores mostram que microdomínios ricos em colesterol e GM1 presentes nas membranas celulares de células alvo específicas participam do processo de invasão de formas infectantes de *T. cruzi*.

Estudos *in vitro* da interação de *T. cruzi* com células do hospedeiro nem sempre envolvem células que são alvos da infecção *in vivo*. Células tumorais e linhagens celulares de diferentes origens, comumente utilizadas nesses estudos, não representam verdadeiramente a situação de interação do parasito com células do hospedeiro mamífero (BARBOSA, 1999). Um dos pontos que ainda permanece em discussão, é o mecanismo de invasão por *T. cruzi* que ocorre em células fagocíticas e fagocíticas não profissionais.

Uma série de estudos tem mostrado que citocalasinas B (CB) e citocalasinas D (CD) bloqueiam a entrada de formas tripomastigotas em macrófagos, células Vero, e fibroblastos (ALEXANDER 1975, NOGUEIRA & COHN, 1976, EBERT & BARBOSA 1981, HENRÍQUEZ et al., 1981, MEIRELLES et al., 1982, ZENIAN & KIERSZENBAUM 1983), enquanto outros mostraram que ocorre invasão de formas tripomastigotas em fibroplastos tratados com CB, células MDCK e células HeLa (SCHENKMAN et al., 1991, SCHENKMAN & MORTARA, 1992).

O tratamento da DC é basicamente constituído por terapêutica farmacológica específica contra o parasito, particularmente em casos agudos, congênitos, acidentes de laboratório e em casos crônicos de infecção recente, além do tratamento sintomático durante o curso da infecção crônica (DIAS, 1999; BLITZMAN, 2007).

Atualmente estão disponíveis apenas dois fármacos para o tratamento da DC, o Nifurtimox (Lampit®, Bayer Healthcare) e o Benzonidazol, cuja patente foi doada ao Ministério da Saúde, Brasil, com índice de cura que varia entre 30% a 70%,

dependendo da cepa do parasito e fase da doença (DIAS, 1999). Entretanto, devido à baixa especificidade da sintomatologia da DC na fase aguda, a maioria dos indivíduos infectados não se trata a tempo e tornam-se portadores crônicos da doença (AMATO-NETO, 1998; CANÇADO, 2002).

Pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra *T. cruzi* têm sido realizadas utilizando frações de DNA do parasito (FUJIMURA et al., 2001), terapia gênica (GARG, TARLETON, 2002). Os esforços para gerar um meio seguro e eficaz de imunizar animais vertebrados, incluindo seres humanos, contra infecções por *T. cruzi* e *Leishmania spp.* iniciados há muitos anos têm obtido pouco sucesso. O uso de parasitos vivos, em geral microrganismos virulentos, apresenta um risco de infecção ativa, porque alguns podem escapar do processo de atenuação. Por outro lado, a possibilidade da utilização de tripanossomatídeos isolados de vegetais inócuos para os seres humanos, mas que compartilham antígenos com espécies patogênicas para o homem pode avivar novas investigações sobre os tripanossomatídeos de vegetais não só sob o olhar bioquímico, mas também sob o olhar imunológico (revisado por SANTOS et al., 2007).

1.4 *Phytomonas serpens* versus *Trypanosoma cruzi*

Várias tentativas de proteger hospedeiros vertebrados contra *T. cruzi* têm sido realizadas desde longa data. Já foram utilizados: parasitos mortos, (SÈNECA et al., 1996; KIERSZENBAUM & BUDZKO, 1975; NEAL & JONHSON, 1977), vivos atenuados, (MENEZES, 1975; TEIXEIRA, 1977; PAIVA et al., 1999) formas de cultivo axênico, (CAMARGO et al., 1991) frações sub-celulares (SEGURA et al., 1974; SEGURA et al., 1977; RUIZ et al., 1986) com soros imunes (KRETTLI, 1982; SAKURADA et al., 1992; SEGURA et al., 1986) ou mesmo com a utilização de anticorpos monoclonais

específicos (FRANCHIN et al.,1997). Em todos esses estudos os resultados foram positivos, com diminuição da parasitemia e aumento da taxa de sobrevivência dos animais testados, mas nenhuma das abordagens utilizadas foi realmente eficaz. Além disso, o uso de parasitos vivos apresenta risco de instalação de infecção ativa, devido a possível inoculação de parasitos viáveis e potencialmente infectantes que tenham escapado ao processo de atenuação (BRENER, 1980).

Investigações realizadas no nosso laboratório concluíram que *Phytomonas serpens*, um tripanossomatídeo isolado de tomates, compartilha antígenos com *Trypanosoma cruzi* e é capaz de gerar uma imunidade protetora em camundongos BALB/c previamente imunizados pela via oral com o parasito de plantas e desafiados com doses letais de formas tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* (Cepa Y) (BREGANÓ et al., 2003). Esta proteção foi dependente da produção de óxido nítrico (NO) e foi capaz de reduzir o número de amastigotas no coração de camundongos infectados (PINGE-FILHO et al., 2005). A imunização por si só não foi capaz de gerar no coração dos camundongos C57BL/6 qualquer tipo de reação inflamatória.

Tendo em vista o grande número de espécies de frutos comestíveis naturalmente infectados por *Phytomonas spp.* que podem ser consumidos “in natura”, propiciando o contato frequente do homem com estes protozoários e pelo fato dos chamados tripanossomatídeos inferiores (monoxênicos, aí incluído o gênero *Phytomonas*) apresentarem correlações antigênicas com *T. cruzi* e serem capazes de gerar imunoproteção (BREGANÓ et al., 2003; PINGE-FILHO et al., 2005) torna-se necessário conhecer quais as relações existentes entre estes dois gêneros em termos do desenvolvimento de respostas imunológicas anti-parasitárias.

1.5 Proteases

Em tripanossomatídios, as peptidases têm sido implicadas na interação parasito-hospedeiro, patogenicidade, sobrevivência intracelular e evasão da resposta imune do hospedeiro, processamento de proteínas do hospedeiro para nutrição e hidrólises de peptídeos de alta especificidade ligados em substratos proteicos (SAJID & MCKERROW, 2002). Cisteínas e metalopeptidases são predominantemente ativas nos tripanossomatídios (BRANQUINHA et al., 1996; SANTOS et al., 2007).

A atividade de proteases tem sido verificada em microrganismos fitopatogênicos e correlacionada com a severidade das doenças nas plantas hospedeiras, representando um importante mecanismo para estabelecimento da infecção (MOSOLOV; GRIGOR'EVA; VALUEVA; 2001). Em tripanossomatídios, alguns processos biológicos como nutrição e crescimento celular, interação com o inseto vetor, evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e sobrevivência intracelular parecem ser dependentes da expressão dessas enzimas (AJID & MCKERROW; 2002). Proteases apresentando similaridade com a gp63 (ELIAS et al, 2009; SANTOS et al, 2007) (principal metalopeptidase de *Leishmania* spp.) e cruzipaina (ELIAS et al, 2009; SANTOS et al, 2006; SANTOS et al, 2007) (principal cisteína protease de *T. cruzi*) (CAZZULO, 2002) foram detectadas em *P. serpens*. Esses peptídeos podem contribuir na adesão do parasito às células do hospedeiro invertebrado (D'AVILA-LEVY et al, 2006; SANTOS et al, 2006; SANTOS et al, 2007). Além disso, essas enzimas podem estar envolvidas com a sobrevivência e crescimento do parasito em seus hospedeiros, uma vez que inibidores de proteases interferem na replicação de *P. serpens* (SANTOS et al, 2006).

Santos e colaboradores (2006; 2007) descreveram a presença de duas cisteína peptidases, apresentando 38 e 40 kDa, localizadas preferencialmente no

citoplasma de formas promastigotas de *P. serpens* 9T. O polipeptídeo de 40 kDa também foi detectado na superfície do parasito. Anticorpos contra cruzipaina de *T. cruzi* e aqueles presentes no soro de pacientes chagásicos reconhecem esses polipeptídeos (ELIAS et al, 2009; SANTOS et al, 2006; SANTOS et al, 2007). Em paralelo, esse mesmo grupo de pesquisa mostrou que anticorpos policlonais contra gp63 de *Leishmania* spp. reconhecem duas metalopeptidases, migrando na faixa de 52 e 63 kDa, na superfície do tripanossomatídeo de planta (D'AVILA-LEVY et al, 2006; SANTOS et al, 2007).

1.6 Trans-sialidase (TS)

O protozoário *Trypanosoma cruzi* expressa uma enzima reguladora de superfície, denominada *trans*-sialidase (TS), envolvida nas interações entre a célula do hospedeiro e o parasito, etapa inicial chave no processo de infecção (VILLALTA et al, 2009; SCHENKMAN et al., 1991) e resistência não específica ao ataque do complemento (TOMLINSON & RAPER, 1998). *T. cruzi* é incapaz de sintetizar ácido siálico e, através da TS, o parasito torna-se apto a transferi-lo de glicoconjugados do hospedeiro e incorporá-lo a moléculas de mucina ligadas à membrana parasitária através de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (PREVIATO et al.,1985). A enzima TS é específica em catalisar, preferencialmente, a transferência de ácido siálico, originando ligações α -2,3 com unidades de β -galactoseceptoras de moléculas de mucina na superfície do parasito (Figura 4). No entanto, apesar de ser primariamente classificada como transferase, promovendo reações reversíveis, a TS possui também ação residual hidrolítica. Algumas destas moléculas de superfície têm sido implicadas na invasão de células de mamíferos.

A família de proteína TcTS é codificada por aproximadamente 140 genes no genoma de *Trypanosoma* (CREMONA et al., 1999), mas vários destes códigos geram produtos inativados (SCHENKMAN et al., 1994; CREMONA et al., 1995).

A grande família dos ácidos siálicos está envolvida em muitos fenômenos fisiológicos. Resíduos de ácido siálico também são importantes como locais de reconhecimento na patogenicidade de processos causados por toxinas de microrganismos (TAYLOR, 1996; SCHAUER, 2004).

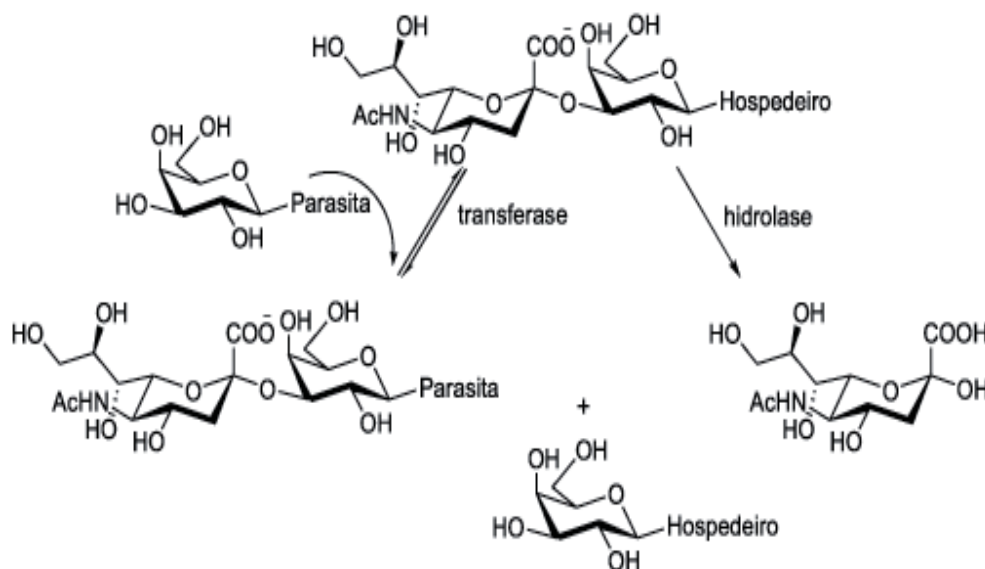


Figura 4. Reação de transferência de ácido siálico do hospedeiro para o parasito pela ação da enzima trans-sialidase. Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v31n5/a15sch01.gif>

Sialidases ou neuraminidases são catalisadores de sialilação de vários glicoconjugados têm sido implicadas como fatores de virulência de doenças causadas por várias bactérias ou vírus. Sialidases também são expressas por alguns protozoários parasitos, incluindo os *Trypanosomas*, *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), *T. cruzi* e *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*). Em *T. brucei*, o agente causador da

tripanossomíase humana Africana, estas enzimas têm essencialmente a atividade da TS, ou seja, que transferem os ácidos sialicos de um glicoconjugado para outro (TAYLOR, 1996; MONTAGNA et al, 2002; FRASCH, 2000). *T. brucei* expressa TS apenas nas fases que parasitam o inseto, ao contrário do caso de *T. cruzi*, que a TS é principalmente expressa durante o parasitismo de mamíferos (TAYLOR, 1996; MONTAGNA et al, 2002). *T. rangeli*, um tripanossoma americano relacionado à *T. cruzi*, expressa uma sialidase sem a atividade TS, mas com alta identidade de sequência de aminoácidos para a enzima de *T. cruzi* (BUSCHIAZZO et al, 2000).

A TS expressa por tripomastigotas infectantes é também liberada para o meio e pode ser detectada no sangue durante o estágio agudo da doença de Chagas, ambos em pacientes e em infecções experimentais (DE TITTO & ARAUJO 1988; LEGUIZAMÓN et al., 1994; RISSO et al., 2004). A enzima liberada pelo parasito persiste no sangue devido aos motivos repetitivos localizados na região terminal Carboxi da proteína (ALVAREZ et al., 2004; BUSCAGLIA et al., 1999). A TS exerce este efeito na corrente sanguínea durante a fase aguda da doença, precisamente quando marca a infecção por *T. cruzi*, tal como supressão imune (KIERSZENBAUM & SZTEIN 1990) e ativação policlonal (MINOPRIO et al., 1989), são observados.

1.7 Alterações hematológicas na Infecção murina por *T. cruzi*

1.7.1 Papel da TS

Entre os efeitos patológicos da DC, podem ser encontrados ainda: alterações hematológicas, aumento do estresse oxidativo e auto-imunidade, que contribuem para a morte. Em seu trabalho pioneiro descrevendo a Tripanossomíase Americana, Carlos Chagas notou que crianças infectadas apresentavam anemia profunda (CHAGAS, 1909).

Camundongos inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi*, apresentam intensa trombocitopenia em adição à anemia (CARDOSO & BRENER, 1980). Essas alterações também são encontradas na tripanosomíase africana (IKEBE *et al.*, 1977), malária (MILLER *et al.*, 1994), leishmaniose visceral (BISWAS *et al.*, 1995) e infecções provocadas por vírus (SINDRE *et al.*, 1996).

A infecção aguda por *T. cruzi* é caracterizada por crescimento exponencial de parasitos e alta mortalidade acompanhada por anemia, trombocitopenia, leucopenia, e hipoplasia medular. As alterações na medula óssea foram caracterizadas pela diminuição no número total de células bem como o número de megacarioblastos e eritroblastos e que camundongos tratados com Nifurtimox durante a primeira semana de infecção foram capazes de impedir essas alterações (MARCONDES *et al.*, 2000).

A administração intravenosa de TS em camundongos reproduziu vários achados patogênicos cruciais observados durante a infecção, tal como alterações no timo via apoptose de timócitos dentro do “complexo de células nurse” (MUCCI *et al.*, 2002), apoptose nos componentes celulares de baço e gânglios (LEGUIZAMÓN *et al.*, 1999), e a trombocitopenia observada no início da infecção aguda (TRIBULATTI *et al.*, 2005). Dependendo ambas a disponibilidade de receptores apropriados e a concentração da enzima, a enzima é capaz de hibridizar ou transferir um ou outro resíduo sialil para o receptor oligosacarídeo (SCHENKMAN *et al.*, 1992). *In vivo*, estas propriedades induzem duas atividades de virulência sobre diferentes componentes celulares. A desialização de plaquetas e células vermelhas provoca eritropenia e trombocitopenia (DE TITTO & ARAUJO 1988; PEREIRA 1983; TRIBULATTI *et al.*, 2005) e torna-se evidente durante a fase aguda da doença

quando a alta atividade enzimática é presente no sangue (DE TITTO & ARAUJO 1988, LEGUIZAMÓN et al., 1994; RISSO et al., 2004).

Por outro lado, a atividade de transferência é capaz de induzir apoptose em órgãos do sistema imune mesmo quando a enzima esta presente em alguns minutos (MUCCI et al., 2006). Vários artigos têm identificado a TS de *T. cruzi* como um fator de virulência distribuído sistemicamente, que ações distantes dos sítios de infecção induzindo dano no sistema imune por mobilização de resíduos sialil na superfície das células (MUIÁ et al., 2010).

1.7.2 Papel do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas quantidades, altamente tóxica devido à presença de um elétron extra que a torna um agente químico altamente reativo. Quando diluído, o NO tem uma meia vida de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito (NO₂) e nitrato (NO₃) (MARLETTA et al., 1988; MAYER et al., 1989; HEVEL et al., 1991, MULLIGAN, HEVEL & MARLETTA, 1991).

O NO tem sido objeto de diversas pesquisas desde a descoberta de seus efeitos biológicos na década de 80 (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1980). É considerado um radical livre e atua como molécula mensageira em diversos processos fisiológicos, como regulação do tônus vascular e neurotransmissor, através do estímulo da síntese de GMP cíclico (BLOODSWORTH, O'DONNELL, FREEMAN, 2000). Seu envolvimento nos processos de agressão e defesa é descrito em diversas doenças (MORI & GOTOH, 2004).

A produção de NO ocorre por meio da ação de um conjunto de enzimas, coletivamente denominadas de óxido nítrico sintase (NOS), que desaminam a L-

arginina para liberar o NO, levando a co-produção de L-citrulina (MULLIGAN, HEVEL & MARLETTA, 1991; BLOODSWORTH, O'DONNELL, FREEMAN, 2000). Inicialmente, a reação gera um composto intermediário, a N^G- hidroxil- L-arginina e ocorre na presença de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio (NADPH), Ca⁺² e O⁻² (Figura 5).

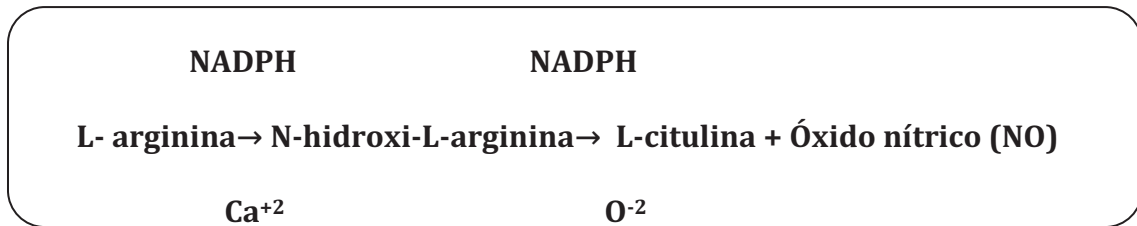


Figura 5. Síntese do óxido nítrico a partir da L- arginina.

Existem várias isoformas de NOS, podendo diferir quanto à disposição dos tecidos, peso molecular e propriedades físicas e funcionais. Propõe-se atualmente, a existência de pelo menos três genes que apresentam “splicing” alternativos para produção dessa enzima (BREDT et al., 1991; LAMAS et al., 1992; LOWENSTEIN et al., 1992). As isoformas de NOS podem ser agrupadas em, sintase do óxido nítrico induzível (iNOS), sintase do óxido nítrico constitutiva (cNOS) e sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) (Figura 6). A cNOS e a eNOS são encontradas no sistema nervoso central e no endotélio vascular, respectivamente, e produzem constitutivamente baixas quantidades de NO (PALMER et al., 1988; MONCADA, PALMER & HIGGS, 1991; BLOODSWORTH, O'DONNELL, FREEMAN, 2000).

A iNOS catalisa a conversão de arginina em citrulina, liberando gás óxido nítrico difundível, que pode se combinar com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou

superóxido (O_2^-) gerado pela enzima fagócito-oxidase nos fagossomas ácidos, para produzir peroxinitrito ($ONOO^-$) altamente reativo, que pode matar diferentes tipos de microrganismos (DE GROOTE et al., 1988). O $ONOO^-$ também é capaz de ocasionar a nitração de proteínas do parasito, agindo como um mecanismo antiparasitário (NAVILIAT et al., 2005).

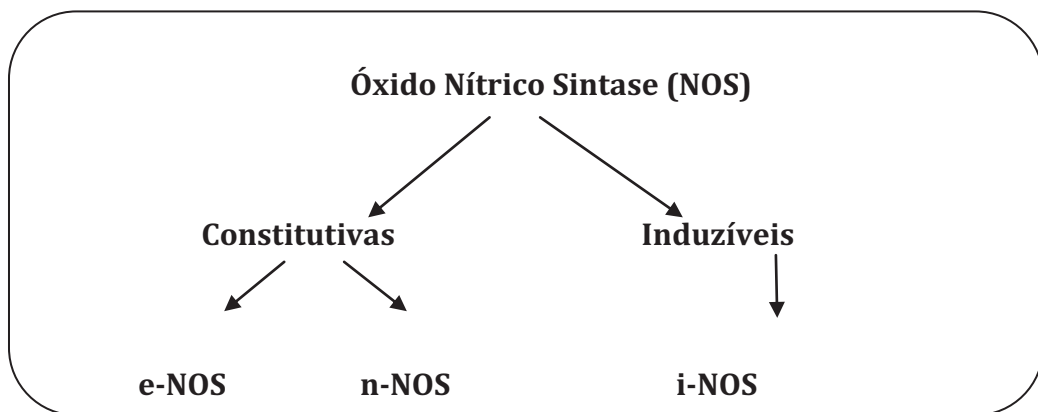


Figura 6. Isoformas da NO-sintase.

As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual. Por exemplo, em baixas concentrações (micromolar, μM), o NO impede a peroxidação de lipídios e também pode agir como uma molécula antioxidante, interrompendo a cadeia de reações oxidativas causadas por outros radicais livres (KRONCKE et al., 1997).

Por outro lado, estudos mostraram que o NO é capaz de se ligar às proteínas que contém o núcleo heme, entre elas a molécula de hemoglobina (Hb) (Revisado por YONETANI, 1988). No sangue circulante a concentração de NO plasmático deve

ser capaz de manter um estado natural de vasodilatação e anticoagulação. Esta homeostase do NO durante o fluxo sanguíneo é mantida por um delicado equilíbrio entre a sua produção pela eNOS e o seu imediato sequestro pela Hb nos eritrócitos e sob condições fisiológicas a concentração de NO é muito menor que a de HB. O NO é sequestrado pela desoxiHb, formando alfa-nitrosil Hb, alfa (FeNO)₂, beta (Fe)₂ onde o NO é fortemente ligado a alfa-subunidades. Após esta ligação a Hb altera a sua conformação para um estado T, de extrema baixa afinidade, suas subunidades tipo beta se tornam eficientes transportadoras de oxigênio. O mesmo mecanismo molecular das alterações de conformação induzidas pelo NO, atua tanto na Hb como na guanilato ciclase, ressaltando-se que a Hb mantém a capacidade de transportar, efetivamente, o oxigênio mesmo após o sequestro do oxigênio. O NO sequestrado pela Hb é, eventualmente, oxidado aerobicamente a NO₃⁻ através da reação $\text{FeNo} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}(+) + \text{NO}_3^-$. A MetHb (Fe+) assim formada é reciclada em desoxiemoglobina(Fe), dentro do eritrócito, por uma Hb redutase completando o sequestro do NO. Assim, o NO, atua como vasodilatador pelo estímulo da guanilato ciclase na musculatura dos vasos e o excesso de NO sequestrado pela Hb pode auxiliar a Hb a liberar O₂ mais eficientemente nos tecidos periféricos (YONETANI, 1988).

Quanto à capacidade tóxica do NO, diversos mecanismos de ação são conhecidos, como por exemplo, (1) a inativação de enzimas ferro-dependentes, pode ocorrer devido a associação do NO ao grupo prostético, ferro e enxofre (Fe-S), ocasionando nitrosilação do seu sítio ativo (OSWALD et al., 1994; JAMES, 1995; MARTINEZ & ANDRIANTSITOHAINA, 2008); (2) a indução da quebra de dupla fita de DNA (SCHAPIRO et al., 2003) e (3) formação do ânion ONOO⁻ como produto da reação que ocorre entre o NO e o radical O₂⁻, que é tóxico para diversos tipos

celulares (DENICOLA et al., 1993; PELUFFO et al., 2004; GENESTRA, 2007). Entretanto, não está totalmente claro qual a concentração exata de NO considerada tóxica para uma célula.

Em modelos experimentais para o estudo da doença de Chagas, a inibição farmacológica da iNOS inibe a capacidade microbicida do macrófago e promove aumento da parasitemia (SILVA et al., 1995; MARTINS et al., 1998). Estes achados têm demonstrado que a resistência à infecção por *T. cruzi* está associada com a capacidade dos linfócitos produzirem de IFN- γ e TNF- α (MUÑOZ FERNÁNDEZ, FERNANDEZ & FRESNO, 1992), os quais ativam os macrófagos a produzirem NO que tem a capacidade de controlar a multiplicação intracelular do *T. cruzi* (GAZZINELLI, OSWALDO & JAMES, 1992; VESPA, CUNHA & SILVA, 1994; TALVANI et al., 2002). Isso ocorre através da ativação das vias JAK/STAT e NF- κ B (XIE, WHISNANT, NATHAN, 1993). Entretanto, Cummings e Tarleton (2004) utilizando linhagens de camundongos nocautes para iNOS, mostraram que estes animais apresentaram sobrevida semelhantes aos animais selvagens. Resultados parecidos foram observados quando camundongos foram desafiados com a cepa Sylvio (MARINHO et al., 2007). Desta forma, estes estudos colocam em dúvida o papel do NO durante a fase inicial da infecção por *T. cruzi*. Estes achados contraditórios podem ser explicados se consideramos que os estudos utilizaram diferentes cepas e linhagens de camundongos. Em adição ao questionamento sobre o papel do NO na infecção experimental, há a indicação de que a participação do NO é estágio-dependente, ou seja, o NO participa no controle da infecção somente na fase aguda da infecção (SAEFTEL, BERNHARD, HOERAUF, 2001).

Em adição, há um número crescente de evidências indicando a participação de linfócitos e dos produtos de macrófagos na indução de mielossupressão durante

a infecção por *T. cruzi*. Então, as alterações no sangue e na medula óssea de camundongos infectados por *T. cruzi* (fase aguda) (CARDOSO & BRENER, 1980; (MARCONDES et al, 2000) podem ser consequência da supressão desencadeada por NO e citocinas ou pelo próprio parasito (PINGE-FILHO et al., 1999).

Atividades supressoras na medula óssea têm sido atribuídas à ação de citocinas, como IFN- α , TNF- α , IFN- γ e MIP-1 α (BINDER et al., 1997; BEN et al., 1990; COOK, 1996; MOLDAWER et al., 1989). Esta hipótese previamente testada por meio de ensaios realizados no nosso laboratório. Nossos dados mostraram que a anemia que se desenvolve em camundongos C57BL/6 infectados por *T. cruzi* é NO-independente (MALVEZI et al, 2004). Em adição, foi demonstrado que o uso de inibidores de prostaglandinas ou o bloqueio da produção de TNF- α provocam um aumento dramático de reticulócitos em camundongos C57BL/6, esse aumento ocorre no momento de maior supressão (Dia 14 de infecção) e foi revertido pelo bloqueio da produção de NO com aminoguanidina (MALVEZI et al, 2004).

Em vista disso e aliado ao fato de que *P. serpens* (Cepa 15 T) confere proteção parcial contra a infecção por *T. cruzi*, decidimos investigar os efeitos da imunização oral de camundongos com *P. serpens* sobre a trombocitopenia e leucopenia que ocorrem durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos imunoprotetores da imunização oral de camundongos com *Phytomonas serpens* (Cepa 15 T) sobre as alterações hematológicas provocadas pela infecção por *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y).

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da imunização oral com *P. serpens* (Cepa 15 T) sobre a trombocitopenia e leucopenia que ocorrem na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* ;
2. Examinar os efeitos da imunização oral com *P. serpens* (Cepa 15 T) sobre a capacidade da tran-sialidase (TS) do *T. cruzi* em induzir trombocitopenia e leucopenia em camundongos;
3. Avaliar a capacidade de soros hiperimunes anti- *P. serpens* em neutralizar a ação da TS como fator de virulência.

REFERÊNCIAS

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABREU FILHO, B.A.; DIAS FILHO, B.P.; VERMELHO, A.B.; ITOW JANKEVICIUS, S.; JANKEVICIUS, J.V.; SANTOS, R.L. Surface componed characterization as taxonomic tools for *Phytomonas spp* identification. Parasitol. Res., 2001; 87: 138-144.

AKIRA, S; UEMATSU S.; TAKEUCHI O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell., 2006; 124:783-801.

ALEXANDER J. Effect of the antiphagocytic agent cytochalasin B on macrophages invasion by *Leishmania mexicana* promastigota and *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J. Protozool, 1975; 22: 237-240.

ALVAREZ P, BUSCAGLIA CA, CAMPETELLA O. Improving protein pharmacokinetics by genetic fusion to simple amino acid sequences. J. Biol. Chem. 2004; 279(5):3375-81

ALVES, M.J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. IUBMB Life. 2007; 59(4-5):274-9.

AMATO-NETO, V. Tratamento específico da Doença de Chagas. Arq. Bras. Cardiol., 1998; 70 (1): 63-64.

ANDRADE, Z. Immunopathology of Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1999; 94: 71-80.

ANDRADE, Z.A. Patologia da Doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M.; *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000; cap. 12, p. 200- 230.

ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Trends Cell Biol. 1995; 5: 133-137.

ARAÚJO-JORGE, T.C. Resposta immune Inata, Inflamatória e de fase aguda na Doença de Chagas. In: ARAÚJO-JORGE, T.C.; CASTRO, S.L. Doença de Chagas. Manual para experimentação animal. 20 ed., Editora Fiocruz, 2000; cap.4, p.39-86.

BARBOSA H. S.; Why studies on invasion of host cell by *Trypanosoma cruzi* using established cell lines or primary cell cultures give conflicting results? Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1999; v. 94 p.153-154.

BATISTOTI, M.; CAVAZZANA Jr, M.; SERRANO, M.G.; OGATTA, S.F.; BACCAN, G.C.; JANKEVICIUS, J.V.; TEIXEIRA, M.M.G.; ITOW JANKEVICIUS, S. Generic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical and molecular taxonomic markers. J. Parasitol., 2001; 87 (6): 1335-1341.

BEN, D.; CHEN, M.; MUELLER,M.; Recombinant Tumor Necrosis Factor enhances the proliferative responsiveness of murine peripheral macrophages to Macrophage-Colony Stimulating Factor but inhibits their proliferative responsiveness to Granulocyte-Macrophage- Colony Stimulating Factor, Blood, 1990; 75. 1627- 1632.

BINDER,D.; FEHR, J.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R.M.; Virus- induced transient bone marrow aplasia: major role of interferon- α/β during acute infection with the noncytopathic lymphocytic choriomeningitis virus. J. Exp. Med. 1997; 185. 517- 530.

BISWAS, T.; GHOSH, D.K.; MUKHERJEE, N.; GHOSAL, J.; Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leishmania donovani*. Mol. Cell. Bioch. 1995; 146:99-105.

BLITZMAN, M. Enfermedad de Chagas- Mazza- ler Congresso Virtual de cardiologia. Disponível em: <http://www.fac.org.ar>. 2007. Acesso em 19 de setembro de 2010.

BLOODSWORTH, A.; O'DONNELL, V.B.; FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme- mediated lipid and lipoprotein oxidation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000; 20: 1707-1715.

BRANQUINHA MH, VERMELHO AB, GOLDENBERG S, BONALDO MC. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. J Eukaryot Microbiol. 1996; 43(2):131-5.

BRETT DS, GLATT CE, HWANG PM, FOTUHI M, DAWSON TM, SNYDER SH. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. Neuron., 1991; 7(4):615-24.

BREGANO, J. W.; PICÃO, R. C.; GRAÇA, V. K.; MENOLLI, R. A.; JANKEVICIUS, S. I.; PINGE-FILHO, P.; JANKEVICIUS, J. V. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS Immunol. Med. Microb.*, 2003; 39 (3): 257-64.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1973; 27: 347-382.

BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Ad. Parasitol.*, 1980; 18: 247-293.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 1987; v.82, p.205-213.

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

BURLEIGH, B.A.; WOOLSEY, A.M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 2002; 4 (11):701-11.

BUSCAGLIA CA, ALFONSO J, CAMPETELLA O, FRASCH AC. Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. *Blood*, 1999; 93 (6):2025-32.

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

CALER, E.V.; CHAKRABARTI, S.; FOWLER, K.T.; RAO, S.; ANDREWS, N.W. The Exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.* 2001; 193(9):1097-104.

CALVET CM, MEUSER M, ALMEIDA D, MEIRELLES MN, PEREIRA MC. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitol.* 2004; 107(1-2):20-30.

CAMARGO IJ, ARAUJO PM, SAKURADA JK, STACH-MACHADO DR, RANGEL HA. *Trypanosoma cruzi*: early resistance induced by culture-derived trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 1991; 73(3):260-8.

CAMARGO, E.P.; *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit, *Adv. Parasitol.* 1999; 42. 29- 112.

CAMPOS M.A. & GAZZINELLI R.T. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Med. Inflamm.* 2004; 13(3): 139-143.

CANÇADO, J.R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas Disease with benzonidazole. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 2002; 44:29-37.

CARDOSO, J.E.; BRENER, Z.; Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1980; 75: 97- 104.

CARVALHO T.M. & DE SOUZA W. Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct*. 1989; 45(6): 498-502.

CATARINO, L.M.; SERRANO, M.G.; CAVAZZANA Jr, M.; ALMEIDA, M.L.; KANESHIMA, E.K.; CAMPANER, M.; JANKEVICIUS, J.V.; TEIXEIRA, M.M.G.; ITOW JANKEVICIUS, S. Classification of trypanosomatids of fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *Fems Microbiol. Letters*. 2001; 201: 67- 72.

CAZZULO J.J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*, potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002; v.2, p.1261-1271.

CHAGAS,C. Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., s.sp. agente etiológico de uma nova entidade mórbida no homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1909; 1: 159-218.

CHAPADEIRO, E. Clinical evolution and morbid- mortality in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1999; 94 (I): 309-310.

CHUENKOVA M. V.; FURNARI F. B.; CAVENEE W. K.; PEREIRA M. A. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. Proc Natl Acad Sci USA, 2001; v.98 p.9936-9941.

COIMBRA VC, YAMAMOTO D, KHUSAL KG, ATAYDE VD, FERNANDES MC, MORTARA RA, YOSHIDA N, ALVES MJ, RABINOVITCH M. Eucleated L929 cells support invasion, differentiation, and multiplication of *Trypanosoma cruzi* parasites. Infect Immun. 2007;75(8):3700-6.

CONCHON, I.; CAMPANER, M.; SBRAVATE, C.; CAMARGO, E. P. *Trypanosomatids*, other than *Phytomonas spp*, isolated and cultured from fruit. J. Protozool, 1989; 36 (4): 412-414.

COOK,D.N.; The role of MIP-1 α in inflammation and hematopoiesis, J. Leuk. Biol. 1996; 59 . 61- 74.

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A.O.; RASSI, A.; ATAYDE, V.D.; YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. Infect Immun. 2003; 71(11):6184-91.

CREMONA ML, CAMPETELLA O, SÁNCHEZ DO, FRASCH AC. Enzymically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. Glycobiology. 1999; 9(6):581-7.

CREMONA ML, SÁNCHEZ DO, FRASCH AC, CAMPETELLA O. A single tyrosine differentiates active and inactive *Trypanosoma cruzi* trans-sialidases. *Gene*. 1995; 160(1):123-8

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.*, 2004; 72 (7): 4081- 4089.

D'AVILA-LEVY C.M., SANTOS L.O., MARINHO F.A., DIAS F.A., LOPES A.H., SANTOS A.L.S., BRANQUINHA M.H. Gp-63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role in the insect interaction. *Current Microbiology*, 2006; v. 52, p.439-444.

DE ARAUJO-JORGE TC, BARBOSA HS, MEIRELLES MN. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992; 87 Suppl 5:43-56.

DE CARVALHO TM, DE SOUZA W. Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct*. 1989; 14 (4):383-92

DE GROOTE, M.A.; GRANGER D, XU Y, CAMPBELL G, PRINCE R, FANG FC. Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(14):6399-403.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. International Review of Cytology, 1984; 86: 197-283.

DE SOUZA, W.; O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brener, Z.; Andrade, Z. A.; Barral- Neto, M.; (Eds) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2000.

DE TITTO EH, ARAUJO FG. Mechanism of cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: importance of sialidase activity. Acta Trop. 1987 Sep;44(3):273-82.

DENICOLA A, RUBBO H, RODRÍGUEZ D, RADI R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. Arch Biochem Biophys. 1993; 304(1):279-86

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M., *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Segunda Edição. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2000; 2 ed, p. 48-74.

DIAS, J.C.P. Chagas disease: successes and challenges. Cad. Saúde Pública, 2006; 22(10):2020-2021.

DIAS, J.C.P., SHOFIELD,C.J. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1999; 94 (I): 103-121.

DOLLET, M.; Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*), Annu. Rev. Phytopathol. 1984; 22. 115- 132.

DOWNWARD, P. PI 3-kinase, Akt and cell survival. Semin Cell Dev. Biol. 2004; 15: 177-182.

DVORAK, J.A. New in vitro approach to quantization of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. New Appr. Am. Trypanosom. Res. Sci. Pub., 1975; 318: 109-20.

EBERT F.; BARBOSA H.S. The influence of cytochalasin B on the interaction of *T. cruzi* and mouse peritoneal macrophages. Rev Inst Med Trop São Paulo, 1981; 23: 61-67.

EICKHOFF, C.S.; GIDDINGS, O.K.; YOSHIDA, N.; HOFT, D.F. Immune responses to gp82 provide protection against mucosal *Trypanosoma cruzi* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(5):687-91.

ELIAS C.G., AOR A.C., VALLE R.S., d'AVILA-LEVY C.M., BRANQUINHA M.H., SANTOS A.L. Cysteine peptidases from *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2009; v. 57, p. 247-256.

FERNANDES AB, NEIRA I, FERREIRA AT, MORTARA RA. Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. Parasitol Res. 2006; 100(1):59-68.

FERNANDES MC, CORTEZ M, GERALDO YONEYAMA KA, STRAUS AH, YOSHIDA N, MORTARA RA. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol.* 2007; 37(13):1431-41.

FERNANDEZ-RAMOS, C.; LUQUE, F.; FERNANDEZ-BECERRA,C.; OSUNA, A.; ITOW JANKEVICIUS, S.; JANKEVICIUS, J.V.; ROSALES, M.J.; SANCHEZ-MORENO, M. Biochemical characterization of flagellates from fruits and seeds from Brazil. *Fems Microbiol. Letters*, 1999; 170: 343- 348.

FORATTINI, O.; Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev. Saúde Públ. São Paulo*, 1980; 14: 265-299.

FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, VL.; SCHENKMAN, S.& RODRIGUES, MM. Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection. *Infect. Immun.*, 1997; p. 2548-2554.

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

FUJIMURA AE, KINOSHITA SS, PEREIRA-CHIOCCOLA VL, RODRIGUES MM. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. *Infect. Immun.* 2001; 69(9):5477-86

FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-6.

GARG,N.; TARLETON, R.L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immunity*, 2002; 70: 5547- 5555.

GAZZINELLI RT, OSWALD IP, JAMES SL, SHER A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol.* 1992; 148(6):1792-6

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for the host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6 (12): 895-906.

GENESTRA M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.* 2007; 19(9):1807-19. Epub 2007 May 1.

GIBBS, A.J. *Leptomonas serpens* n SP parasitic in the digestive tract and salivary gland of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (Tomato) and other plants. *Parasitol.* 1957; 47: 297- 303.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas Disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence or both? *Trend. Parasitol.* 2003; 19 (1): 19-22.

GONZÁLEZ-HALPHEN, D.; MASLOV, D.A.; NADH- ubiquinone oxidoreductase activity in the kinetoplasts of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*, Parasitol. Res. 2004; 92 341- 346.

HALL B.F., WEBSTER P., MA A.K., JOINER K.A., ANDREWS N.W. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. J. Exp. Med. 1992; 176: 313-325.

HENRIQUEZ D.; PIRAS R.; PIRAS M. M. The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol, 1981; v.2 p. 359-366.

HEVEL JM, WHITE KA, MARLETTA MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. J. Biol. Chem. 1991; 266(34):22789-91.

IKEBE, B.O.; LULE, M.; TERRY, R.J.; Anemia in trypanosomiasis: Mechanisms of erythrocyte destruction in mice with *Trypanosoma congolense* or *Trypanosoma brucei*. Acta Tropica, 1977; 34: 53-60.

JAMES SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiol Rev. 1995; 59(4): 533-547.

JANKEVICIUS, J.V.; JANKEVICIUS, S.I.; CAMPANER, M.; CONCHON, I.; MAEDA, L.A.; TEIXEIRA, M.M.G.; FREYMULLER, E.; CAMARGO, E.P.; Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes, J. Protozool. 1989; 36. . 265- 271.

KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R.A.; CODER, D.; ARUFFO, A.; FARR, A. The major surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. Infect. Immun., 1996; 64 (7): 2649- 2656.

KIERSZENBAUM F, SZTEIN MB. Mechanisms underlying immunosuppression induced by *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today. 1990; 6(8):261-4

KIERSZENBAUM, F. & BUDZKO, D.B. Immunization against experimental Chagas' disease by using culture forms of *Trypanosoma cruzi* killed with a solution of sodium perchlorate. Infect Immun., 1975; 12:461-465.

KIRCHHOFF, L.V. American trypanosomiasis (Chagas' disease). Gastroenterol. Clin. North Am., 1996; 25: 517-533.

KRETTLI, A. U. Antibodies to *T. cruzi* in experimental and human infections. Afri. J. Clin .Exp. Immunol., 1982; 3: 327-345.

KRÖNCKE KD, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? Nitric Oxide, 1997; 1(2):107-20

LAMAS S, MARSDEN PA, LI GK, TEMPST P, MICHEL T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992; 89(14):6348-52.

LEGUIZAMÓN MS, CAMPETELLA O, RUSSOMANDO G, ALMIRON M, GUILLEN I, GANZÁLEZ CAPPAS SM, FRASCH AC. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. J. Infect. Dis. 1994; 170(6):1570-4.

LEGUIZAMÓN MS, CAMPETELLA OE, GONZÁLEZ CAPPAS SM, FRASCH AC. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. Infect. Immun. 1994; 62(8):3441-6.

LEY, V.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N.W. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med. 1990; 171(2):401-13

LOPEZ M., HUYNH C., ANDRADE L.O., PYPAERT M., ANDREWS N.W. Role of sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. Mol. Biochem. Parasitol. 2002; 119: 141- 145.

LOWENSTEIN CJ, GLATT CS, BRETT DS, SNYDER SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992; 89(15):6711-5

MAGUIRRE, J. H.; HOFF, R. Cardiac morbidity and mortality due to Chagas disease: prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation*, 1987; 75 (6): 1140-1145.

MALVEZI, A.D.; CECCHINI, R.; SOUZA, F.; TADOKORO, C.E.; RIZZO, L.V.; PINGE-FILHO, P.; Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2004; 41. 69-77.

MARCONDES MC, BORELLI P, YOSHIDA N, RUSSO M. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect.* 2000; 2(4):347-52

MARINHO CR, NUÑEZ-APAZA LN, MARTINS-SANTOS R, BASTOS KR, BOMBEIRO, A.L.; BUCCI, D.Z.; SARDINHA, L.R.; LIMA, M.R.; ALVAREZ, J.M. IFN-gamma, but not nitric oxide or specific IgG, is essential for the in vivo control of low-virulence Sylvio X10/4 *Trypanosoma cruzi* parasites. *Scand J. Immunol.* 2007; 66(2-3):297-308.

MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD, WISHNOK JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry.* 1988; 27(24):8706-11

MARTÍNEZ, M.C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(3):669-702.

MARTINS, G.A.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol Lett.* 1998; 63(2):113-20.

MAYER B, SCHMIDT K, HUMBERT P, BÖHME E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 164 (2): 678-85.

MCGHEE, R.B.; COSGROVE, W.B.; Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae, *Microbial. Rev.* 1980; 44. 140- 173.

MEIRELLES, M.N.L.; ARAUJO-JORGE T.C.; MIRANDA C.F., DE SOUZA W.; BARBOSA H.S. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Z Parasitenkd*, 1982; 68:7-14.

MEIRELLES, M.N.L.; PEREIRA, M.C.S.; SINGER, R.H.; SOEIRO, M.N.C.; GARZONI, L.R.; SILVA, D.T.; BARBOSA, H.S.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; MASUDA, M.O.; CAPELLA, M.A.M.; LOPES, A.G.; VERMELHO, A.B. *Trypanosma cruzi*- cardiomyocytes: New contributions regarding a better understanding of this interaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1999; 94 (I): 149-152.

MENEZES, H. The uninfectivity of the PF cultivated strain of *T. cruzi* to mice. An evolution through a one year period by blood cultures and hystopathology. *Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.*, 1975; 12:1.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature Rev.*, 2006; 442 (6): 39-44.

MILLER, L.H.; GOOD, M.F.; MILON, G.; Malaria pathogenesis, *Science*, 1994; 264: 1878- 1883.

MING M., EWEN ME., PEREIRA M.E.A. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF β signaling pathway. *Cell*. 1995; 82:287-296.

MINOPRIO P, BANDEIRA A, PEREIRA P, MOTA SANTOS T, COUTINHO A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *Int Immunol*. 1989; 1(2):176-84.

MOLDAWER, L.L.; MARANO, M.A.; WEI, H.; FONG, Y.; LILEN, M.L.; KUO, G.; MANOGUE, K.R.; VLASSARA,H.; COHEN,H.; CERAMI, A.; Cachectin/ Tumor necrosis factor alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia *in vivo*, *FASEB J*. 1989; 3. 1637- 1643.

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(2):109-42.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003; 98(5): 577- 591.

MONTAGNA, G.; CREMONA, M.L.; PARIS, G.; AMAYA, M.F.; BUSCHIAZZO, A.; ALZARI, P.M.; FRASCH, A.C. The trans-sialidase from the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 2002; 269 (12) 2941- 2950.

MORI, M.; GOTOH, T. Arginine metabolism: enzymology, nutrition, and clinical significance. J. Nutr., 2004; 134: 2820S.

MOSOLOV V.V., GRIGOR'EVA L.I., VALUEVA T.A. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. Applied Biochemistry and Microbiology, 2001; v.37, p.115-123.

MUCCI J, HIDALGO A, MOCETTI E, ARGIBAY PF, LEGUIZAMON MS, CAMPETELLA O. Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(6):3896-901.

MUCCI J, RISSO MG, LEGUIZAMÓN MS, FRASCH AC, CAMPETELLA O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. Cell Microbiol. 2006; 8(7):1086-95.

MUIÁ RP, YU H, PRESCHER JA, HELLMAN U, CHEN X, BERTOZZI CR, CAMPETELLA O. Identification of glycoproteins targeted by *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, a

virulence factor that disturbs lymphocyte glycosylation. *Glycobiology*. 2010; 20(7):833-42.

MULLER, E.; GARGANI, D.; BANULS, A.L.; TIBAYRENC, M.; DOLLET, M. Classification of plant Trypanosomatids (*Phytomonas spp*): party between random- primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Parasitol*. 1997; 115: 403-409.

MULLIGAN MS, HEVEL JM, MARLETTA MA, WARD PA. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A*. 1991; 88 (14): 6338-42.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ MA, FERNÁNDEZ MA, FRESNO M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett*. 1992; 33(1):35-40.

NAVILIAT, M.; GUALCO, G.; CAYOTA, A.; RADI, R. Protein 3- nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Bras. J. med. Biol. Res.*; 2005; 38: 1825-1834.

NEAL, R.A. & JONHSON, P. Immunization against *Trypanosoma cruzi* using killed antigens and with saponin as adjuvant. *Acta Tropica*, 1977; 34: 87-96.

NOGUEIRA N.; COHN Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 1976; 143:1402-1420.

OSWALD IP, WYNN TA, SHER A, JAMES SL. NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1994; 108(1):11-8.

PAIVA, C.N., CASTELO-BRANCO, M.T., LANNES-VIEIRA, J. & GATTASS C.R. *Trypanosoma cruzi*: protective response of vaccinated mice is mediated by CD8⁺ cells, prevents signs of polyclonal T lymphocyte activation, and allows restoration of a resting immune state after challenge. *Exp. Parasitol.* 1999; 91(1): 7-19.

PAIVA, C.N.; SOUTO-PADRON, T.; COSTA, D.A.; GATTASS, C.R. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitology.* 1998; 117 (Pt 5):483-90.

PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333(6174):664-6.

PELUFFO G, PIACENZA L, IRIGOÍN F, ALVAREZ MN, RADI R. L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol.* 2004; 20(8):363-9.

PEREIRA ME. A rapid and sensitive assay for neuraminidase using peanut lectin hemagglutination: application to *Vibrio cholera* and *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol Methods.* 1983; 63(1):25-34.

PINGE-FILHO, P.; PERON, J. P. S.; MOURA, T. R.; MENOLLI, R. A; GRAÇA, V. K.; ESTEVÃO, D.; TADAKORO, C .E.; JANKEVICIUS, J. V.; RIZZO, L. V. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Imunol. Letters*, 2005; 96: 283-290.

PINGE-FILHO. P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I.A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cellular Immunology.*, 1999; 193, 90-98.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet. Infect. Dis.*, 2001; 1 (2): 92-100.

PRATA, A. Chagas' disease. *Infect Dis Clin North Am.* 1994; 8(1):61-76.

PREVIATO JO, ANDRADE AF, PESSOLANI MC, MENDONÇA-PREVIATO L. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Mol Biochem Parasitol.* 1985; 16(1):85-96.

PROCÓPIO D.O., BARROS H.C., MORTARA R.A. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Cell Biol.* 1999; 78: 911-924.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, .IA.; NAVARRO, V. S.; VASAVADA, B. C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.*, 2007; 115 (3): 279-83.

RAMIREZ, M.I.; RUIZ, R.D.E.C.; ARAYA, J.E.; DA SILVEIRA, J.F.; YOSHIDA, N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infect Immun.* 1993; 61(9):3636-41

RASSI A JR, RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010; 375(9723):1388-402.

RISSO MG, GARBARINO GB, MOCETTI E, CAMPETELLA O, GONZALEZ CAPPAS SM, BUSCAGLIA CA, LEGUIZAMON MS. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis.* 2004; 189(12):2250-9. Epub 2004 May 25.

RODRÍGUEZ A., RIOULT M.G., ORA A., ANDREWS N. A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol.* 1995; 129: 1263- 1273.

RODRÍGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M.G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by Trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J. Cell. Biol.*, 1996; 134 (2):349-362.

RUBIN-DE-CELIS S.S.C.; UEMURA H.; YOSHIDA, N. SCHENKMAN S. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole . *Cell Microbiol* 2006; 8 (12): 1888–1898.

RUIZ RC, FAVORETO S JR, DORTA ML, OSHIRO ME, FERREIRA AT, MANQUE PM, YOSHIDA N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J.* 1998; 330 (Pt 1):505-11.

RUIZ, A. M.; ESTEVA M.; RIARTE, A.; SUBIAS, E; & SEGURA, E. L. Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvante. *Immunol Letters*, 1986; 12: 1-4.

RUIZ, R. C.; RIGONI V. L.; GONZALEZ J.; YOSHIDA N. The 35/50 kDa surface antigen of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes, an adhesion molecule involved in host cell invasion. *Parasite Immunol*, 1993; v .15; p. 121-125.

SABROE, I.; PARKER, L.C.; DOWER, S.K.; WHYTE, M.K.B. The role of TLR activation in inflammation. *J. Pathol.*, 2008; 214: 126-135.

SAEFTEL, M., FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Stage- dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 2001; 69: 2252- 2259.

SAJID M., MCKERROW J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2002; v.120, p.1-21.

SAKURADA, J. K.; MAURY, A.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; ARAUJO, P. M. F.; CAMARGO, I. J. B. & RANGEL, H. A. Anti- *Trypanosoma cruzi* proteinase antibodies and

immunoprotection in experimental Chaga's disease. Res. Immunol., 1992; 143: 157-164.

SÁNCHEZ-MORENO M, FERNÁNDEZ-BECERRA C, FERNÁNDEZ-RAMOS C, LUQUE F, RODRIGUEZ-CABEZAS MN, DOLLET M, OSUNA A. Trypanosomatid protozoa in plants of southeastern Spain: characterization by analysis of isoenzymes, kinetoplast DNA, and metabolic behavior. Parasitol Res. 1998; 84(5):354-61.

SANCHEZ-MORENO M, LASZTITY D, COPPENS I, OPPERDOES FR. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas spp.* isolated from *Euphorbia characias*. Mol Biochem Parasitol. 1992; 54(2):185-99.

SANTOS A.L., D'ÁVILA-LEVY C.M., DIAS F.A., RIBEIRO R.O., PEREIRA F.M., ELIAS C.G., SOUTO-PADRÓN T., LOPES A.H., ALVIANO C.S., BRANQUINHA M.H., SOARES R.M. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. International Journal for Parasitology, 2006; v.36, p.47-56.

SANTOS A.L., D'ÁVILA-LEVY C.M., ELIAS C.G., VERMELHO A.B., BRANQUINHA M.H. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. Microbes and Infection, 2007; v.9, p.915-921.

SCHAPIRO JM, LIBBY SJ, FANG FC. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003; 100(14):8496-501.

SCHAUER, R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*, 2004; 107, 49-64.

SCHENKMAN S, DIAZ C, NUSSENZWEIG V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* 1991; 72(1):76-86.

SCHENKMAN, S.; MORTARA, R.A. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J. Cell Sci.* 1992; 101 (Pt 4):895-905.

SCHENKMAN,S.; EICHINGER,D.; PEREIRA, M.E.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1994; 48:499-495.

SEGURA EL, CURA EN, PAULONE I, VASQUEZ C, CERISOLA JA. Antigenic makeup of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *J. Proto.* 1974;21(4):571-4.

SEGURA EL, VAZQUEZ C, BRONZINA A, CAMPOS JM, CERISOLA JA, CAPPA SM. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and membrane fraction. *J. Proto.* 1977;24(4):540-3.

SEGURA, EL.; BUA, J.; CAMPANINI, AR.; SUBIAS, E.; ESTEVA, M.; MORENO, M.; RUIZ, AM. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of

Trypanosoma cruzi: C-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. Immunol. Letters., 1986; 13: 165-171.

SÊNECA, H., PEER, P., & HAMPAR, B. Active immunization of mice with chagastoxin. Nature, 1996; 209:309-310.

SERRANO, M.G.; NUNES, L. R.; CAMPANER, M.; BUCK, G.A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M.G. Trypanosomatidae *Phytomonas* detection in plants and Phytophagous Insects by PCR Amplification of Genus- specific Sequence of the Spliced Leader gene. Exp. Parasitol. 1999; 91: 268- 279.

SILVA GK, GUTIERREZ FR, GUEDES PM, HORTA CV, CUNHA LD, MINEO TW, SANTIAGO-SILVA J, KOBAYASHI KS, FLAVELL RA, SILVA JS, Zamboni DS. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol. 2010;184(3):1148-52

SILVA JS, VESPA GNR, CARDOSO MAG, ALIBERTI JC, CUNHA FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. Infect. Immun. 1995; 63:4862-4867.

SINDRE,H.; TJONNFJORD, G.E.; ROLLAG, H.; RONNENBERG- NIELSEN,T.; VEIBY, O.P.; BECK,S.; DEGRÉ, M.; HESTDAL, K.; Human cytomegalovirus suppression of and latency in early hematopoietic progenitor cells, Blood 1996; 88. 4526- 4533.

TALVANI, A.; MACHADO, F. S.; SANTANA, G. C.; KLEIN, A.; BARCELOS, L.; SILVA, J. S.; TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B4 Induces Nitric Oxide Synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected Murine macrophages and mediates Resistance to infection. *Infect. Immun.*, 2002; 70 (8): 4247-4253.

TANOWITZ H, WITTNER M, KRESS Y, BLOOM B. Studies of in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1975;24(1):25-33

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* 1992;71(7):1117-30

TAYLOR, G.; Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1996; 6, 830- 837.

TEIXEIRA, A.R. Immunoprophylaxis against Chagas' disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1977; 93:243-280.

TEIXEIRA, A.R.L. The Stercorarian trypanosomes. In: Soulsby, E. J. L. *Immune response in parasitic infections: immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis.* Boca Raton: CRC Press, Inc., 1987; p. 25-118.

TEIXEIRA, A.R.L.; MONTEIRO, P.S.; REBELO, J.M.; ARGANÁRAZ, E.R.; VIEIRA, D.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.; VEXENAT, C.A.; SILVA, A.R.; AULT, S.K.; COSTA, J.M.; Emerging Chagas Disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from Palm Trees in the Amazon. *Em. Infec. Dis.*, 2001; 7 (1): 100-112.

TEIXEIRA, A.R.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A. Chagas disease. *Postgrad. Med. J.* 2006; 82:788-798.

TOMLINSON S, RAPER J. Natural human immunity to trypanosomes. *Parasitol Today.* 1998;14(9):354-9

TRIBULATTI, M.V.; MUCCI, J.; ROOIJEN, N.V.; LEGUIZAMÓN, M.S.; CAMPETELLA, O.; The trans-sialidases from *Trypanosoma cruzi* Induces Thrombocytopenia During Acute Chagas' Disease by Reducing the Platelet Sialic Acid Contents. *Infection and Immunity*, 2005; vol. 73, no 1. p. 201- 207.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Intern J. Parasitol.* 2001; 31: 472-481.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immune.*, 1994; 62: 5177-5182.

VICKERMAN, K.; The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates, *Int. J. Parasitol.* 1994; 24. 1317- 1331.

VICKERMEN & PRESTON. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. Em: Lumsden WHR, Evans DA (eds). Biology of kinetoplastida, vol I. London: Academic Press, 1976; pp 66-102.

VILLALTA F, SCHARFSTEIN J, ASHTON AW, TYLER KM, GUAN F, MUKHERJEE S, LIMA MF, ALVAREZ S, WEISS LM, HUANG H, MACHADO FS, TANOWITZ HB. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*-host cell receptor interactions. Parasitol Res. 2009;104(6):1251-60. Epub 2009 Mar 13.

WAGHABI M.C.; KERAMIDAS M.; CALVET C. M.; MEUSER M.; SOEIRO,M.C.N.; MENDONÇA-LIMA L.; ARAÚJO-JORGE T.C; FEIGE J.Q; BAILLY S. SB-431542, a transforming growth factor beta inhibitor, impairs *Trypanosoma cruzi* infection in cardiomyocytes and parasite cycle completion. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51 (8): 2905-10.

WANDERLEY, D.M.V.; LITVOC, J. Doença de Chagas como causa básica de óbito na região sudeste do Brasil: presença de causas contributárias. Rev. Saúde Pub., 1994; 28: 69-75.

WHO (World Health Organization) (2004). Chagas Disease. Site: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>. Acesso em 28 de Janeiro de 2009. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>. Acesso em 28 de Outubro de 2010.

WILKOWSKY S.E., BARBIERI M.A., STAHL P., ISOLA E.L.D. *Trypanosoma cruzi* phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res.* 2001; 264: 211-218.

WYLLIE D.H., KISS-TOTH E., VISINTIN A., SMITH S.C., BOUSSOUF S., SEGAL D.M., DUFF .W., DOWER S.K. Evidence for an accessory protein function for Toll like receptor 1 in anti bacterial responses. *J. Immunol.* 2000; 165: 7125-7132.

XIE, Q.; WHISNANT, W.R.; NATHAN, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium- independent nitric oxide syntase confers inducibility by interferon and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 1994; 177: 1779- 1784.

YONETANI, T. Nitric oxide and hemoglobin. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1988; 112: 155-60.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Letras*, 2006; 78 (1): 87-111.

YOSHIDA, N.; FAVORETO, S. JR.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J. Med. Biol. Res.* 2000;33(3):269-78.

ZENIAN A.; KIERSZENBAUM F. *Trypanosoma cruzi*: differences in cell surface interaction of circulating (trypomastigote) and culture (epimastigote) forms with macrophges. *J. Parasitol*, 1983; 69; 660-665.

MANUSCRITO

4.MANUSCRITO

Title: Oral immunization with *Phytomonas serpens*, a phytoflagellate trypanosomatid, attenuates thrombocytopenia and leukopenia induced by trans-sialidase (TS) from *Trypanosoma cruzi*

Rosiane V. da Silva^a, Aparecida D. Malvezi^a, Vera Lucia H. Tatakihara^a, Lucy M. Yamauchi^b, Sueli F. Yamada-Ogatta^b; Luiz V. Rizzo^c, Sergio Schenkman^d, Phileno Pinge-Filho^{a,*}

^a *Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.*

^b *Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.*

^c *Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

^d *Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, São Paulo, Brasil.*

Running head: Immunization with *P. serpens* attenuates thrombocytopenia

Keywords: Chagas' disease; Leukopenia; *Phytomonas serpens*; Thrombocytopenia; Trans-sialidase

Abbreviations used: TS, Trans-sialidase; TS-mb, Trans-sialidase-neutralizing monoclonal antibody; GYPMI, glucose, yeast extract, peptone, meat infusion; PBS, phosphate-buffered saline; anti-PS, immune sera anti-*P. serpens*.

***Corresponding author at:** Phileo Pinge-Filho Ph.D., Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.), Tel: + 55 43 3371-4978; Fax: + 55 43 3371-4465.

ABSTRACT

Mice infected by *Trypanosoma cruzi*, the parasitic protozoan agent of American trypanosomiasis or Chagas' disease, rapidly developed anemia, thrombocytopenia and leukopenia. The parasite sheds trans-sialidase (TS), a virulent factor that depletes the sialic acid content of platelet and induces the accelerated clearance of platelets that lead to the thrombocytopenia observed during acute phase of disease. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares common antigens with *T. cruzi*, but TS activity is absent. Our objective was analyze the effect of oral immunization of mice with *P. serpens* on thrombocytopenia and leucopenia induced by infection with *T. cruzi* or TS injection. Initially, using a murine model of *T. cruzi* infection, we demonstrated that C57BL/6 mice immunized with *P. serpens* and later challenged with a lethal inoculum of *T. cruzi* blood forms showed a significant decrease in thrombocytopenia and leukopenia compared to non-immunized mice. We found that a single intraperitoneal injection of TS into naive mice reduced the platelet count by 50%, a transient effect that lasted as long as the enzyme remained in the blood. A reduction in thrombocytopenia was observed in mice inject with TS and previously immunized with *P. serpens*, when compared to non-immunized mice. In addition, the passive transfer to mice of TS neutralized by monoclonal antibody anti-TS or by immune sera raised in mice against *P. serpens* prevented the clearance of platelets. In conclusion, our results demonstrate that thrombocytopenia induced by *T. cruzi* infection or TS from *T. cruzi* is attenuated by immunization with *P. serpens*, a phytoflagellate trypanosomatid.

INTRODUCTION

The family Trypanosomatidae of the order Kinetoplastida is composed of flagellated unicellular organisms, including extra and intracellular parasites responsible for severe diseases in humans, animals and plants, as well as various free-living forms found in soil and aquatic environments (McGhee and Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994).

The combined number of people infected by kinetoplastid pathogens is estimated to be over 20 million, resulting in various health problems and more than 100,000 deaths each year. With half a billion of people at risk, mostly in the tropical and subtropical areas of the world, these parasites represent an important global health problem with associated significant economic burden (Stuart, 2008).

Most of the recognized genera of the order Kinetoplastida are parasitic protozoa and, depending on host range, have been classified as either monoxenous trypanosomatids including *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas* and *Rhynchoidomonas* or heteroxenous trypanosomatids represented by the genus *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* and *Phytomonas* (Santos et al., 2007).

Phytomonas are etiologic agents of plant diseases found over a wide range of geographical areas including southern Brazil, North and Central Africa and, in the western hemisphere, in several European countries. *Phytomonas* are found in plants of great economical importance including cashew, coffee, cassava, coconut and oil palms, infecting also edible fruits such as tomato, orange, guava, grape, star fruit and many others (Dollet, 1984; Camargo et al., 1990; Camargo, 1999). The life cycle of the parasite in the insect vector and plants was demonstrated by Jankevicius and collaborators (1989) who showed in controlled laboratory cage experiments that *P.*

serpens, the tomato parasite, is transmitted by the bite of the coreid insect *Phthia picta*.

Infection by *Trypanosoma cruzi*, a trypanosomatid haemoflagellate, results in Chagas' disease. *T. cruzi* is transmitted by a blood-feeding triatomine insect vector, although blood transfusion and organ transplantation can also occur (Moncayo and Ortiz Yanine, 2006). The disease affects about 8 million people in Latin America, of whom 30-40% either have or will develop cardiomyopathy, digestive megasyndromes, or both (Rassi et al., 2010). The variability in disease outcome has been attributed to host responses as well as parasite heterogeneity (Junqueira et al., 2010).

The murine experimental infections usually show an acute stage with high parasitemia and prominent inflammatory infiltrates in several tissues, including the heart and skeletal muscles (Soares and Santos, 2009).

T. cruzi infection in mice is associated with severe hematological changes, including thrombocytopenia (Cardoso and Brener, 1980), neutropenia followed by neutrophilia and eosinophilia (Repka et al., 1985), which may contribute to mortality. Similar hematological alterations have also been described in experimental African trypanosomiasis (Ikede et al., 1977) and are a common characteristic of human immunodeficiency virus infection (Claster, 2002) and malaria (Paul and Brey, 2003). Marcondes and collaborators (2000) reported that experimental acute *T. cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia and that these alterations can be prevented by nifurtimox (an anti-trypanosomal drug) treatment.

The mechanisms responsible for these hematological alterations are not clearly understood. Our previous studies revealed that nitric oxide (NO) does not

play a direct role in the development of anemia during *T. cruzi* infection, but contribute together with TNF- α to oxidative pre-hemolytic damage of erythrocytes in infected mice (Malvezi et al., 2004). Tribulatti and collaborators (2005) demonstrated that trans-sialidase (TS) of *T. cruzi* depletes sialic acid in platelets, increasing its clearance and leading afterwards to thrombocytopenia observed during the acute phase of infection. In addition, it has been shown that IFN-inducible p47GTPase (LRG-47) influences *T. cruzi* control by simultaneously regulating macrophage microbicidal activity and hemopoietic function (Santiago et al., 2005).

The immunological cross-reactivity between *T. cruzi* and insect trypanosomatids that belong to the genera *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* and *Blastocrithidia* as well as between *T. cruzi* (Lopez et al., 1981) and *Leishmania spp.* (Gonçalves et al., 2002) was observed. Accordingly, we showed that *P. serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *T. cruzi*, but TS activity is absent (Medina-Acosta, 1994). These antigens are recognized by human sera and induce protective immunity in susceptible BALB/c mice (Bregano et al., 2003; Graça-de-Souza et al., 2010) which is nitric oxide-dependent (Pinge-Filho et al., 2005).

There is no information about how protective immunity induced by *P. serpens* could be modulating the biological activity of TS from *T. cruzi* on thrombocytopenia and leukopenia during acute Chagas' disease.

Here we report that the previous immunization with *P. serpens*, a tomato parasite, prevented the clearance of platelets and leukocytes from circulation in *T. cruzi*-infected mice. Furthermore, neutralization of the circulating TS with antibody anti-*P. serpens* or monoclonal antibody anti-TS attenuated thrombocytopenia induced by TS in vivo. Our results support the hypothesis that TS from *T. cruzi* is a virulent factor involved in the hematological alterations observed early during

infection and claim the use of the lower trypanomatids as a safer source of immunogenic agents for Chagas' disease.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Six to 8 week-old C57BL/6 female and male mice were supplied by the Multi-Institutional Center for Biological Investigation of the State University of Campinas, Brazil. Mice were maintained under standard conditions in animal house of the Department of Pathological Sciences, Centre for Biological Sciences, State University of Londrina. Commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Nuvital, Campo Mourão, Brazil) and water sterilized were available *ad libitum*. Data analysis failed to reveal an influence of sex on the outcome of the experiments performed. All procedures with the animals were in accordance with the guidelines of the Brazilian Code for the Use of Laboratory Animals, the protocols being approved by the Internal Scientific Commission and the Ethics in Animal Experimentation Committee of the Londrina State University (CEEA-01/09)

Parasites

T. cruzi Y strain (Silva and Nussenzweig, 1953) generous gift from Dr. Paulo Araújo, State University of Campinas, Brazil, was maintained by weekly intraperitoneal (i.p.) inoculation of 2×10^5 trypomastigotes forms on Swiss mice. To conduct our experiments, the blood from previously inoculated Swiss mice was obtained by cardiac puncture with heparinized syringes.

P. serpens 15T strain, isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit (Jankevicius et al., 1989), was cultured in GYPMI (glucose, yeast extract, peptone, meat infusion) medium (Breganó et al., 2003) at 28°C.

Immunization of mice and challenge with *T. cruzi*

For immunization of C57BL/6 living forms of *P. serpens* (15T strain) collected at the log phase of growth were washed three times by centrifugation at 3000 x g for 5 min in 15 mM PBS (phosphate-buffered saline), pH 7.2, and administered by gavage per os. Each inoculum consisted of 2×10^8 living parasites per 0.1mL in 15 mM PBS, pH 7.2 and was given four times at one-week intervals (Breganó et al., 2003). Seven days after the last oral immunization with *P. serpens*, C57BL/6 mice were infected i.p with trypomastigotes forms (5×10^3 or 10^5 cells/animal, non lethal dose and lethal dose, respectively). Control mice received PBS alone.

Hematological methods

Leukocytes from control (non-infected) and infected mice under ether anesthesia were collected by cardiac puncture with heparinized needles and syringes and counted by standard methods (Dacie and Lewis, 1994). Platelets were counted in peripheral blood from anesthetized control and infected mice, which was added to polypropylene tubes containing 3.8% (wt/vol) sodium citrate (citrate/blood ratio, 1:9) (Tribulatti et al., 2005). All the manipulations were carried out at room temperature. The number of platelets and leukocytes was determined by manual counting with a Neubauer hemocytometer. All blood analysis and cell counts were performed 7, 12 or 21 days post-infection.

Bone marrow cell harvest

Bone marrow cells were harvested by flushing the femoral shafts with ice cold PBS. The total number of megakaryocytes was determined by hemacytometer counting. For counts, the cell suspension was obtained from uninfected and day 12-infected mice (Marcondes et al., 2000; Hideko Tatakihara et al., 2008).

Trans-Sialidase (TS) production and purification

Recombinant TS was generated and purified from *Escherichia coli* cells transformed with plasmid pTS-cat7, as described previously (Ribeirão et al., 1997). The purity of each TS batch was checked by sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Harlow and Dane 1988), and the protein concentration was estimated by the Bradford procedure (Harlow and Dane, 1988).

Monoclonal antibody anti-TS (mAb 39)

A TS-neutralizing mouse monoclonal antibody (immunoglobulin IgG2b) was purified by protein A-Sepharose from ascitic fluids as described previously (Schenkman et al., 1991).

Mouse immune sera

Ten C57BL/6 male mice were administered by gavage with 2×10^8 living culture forms of *P. serpens* (15T strain) four times at 7-day intervals. One week after the last inoculum, mice were bled by cardiac puncture and sera were tested by means of direct agglutination as described by us previously (Breganó et al., 2003).

TS administration in mice

Animals were injected i.p with 50 µg of enzyme for each experiment in 0.1 ml of PBS as described previously (Tribulatti et al., 2005). Control mice received PBS alone. In two separate experiments, mice received a single dose (0.1 ml) of immune sera anti-*P. serpens* or mAb 39 mixed with purified TS (50 µg) at 15 min at room temperature. Twenty-four hours after injection, platelets and leukocytes counts were conducted.

Statistical Analysis

The statistical analysis was conducted using ANOVA with the Bonferroni test. Comparisons between two experimental groups were performed using Student's *t* test. Values are presented as mean ± SE. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Y strain of *T. cruzi* induced transient thrombocytopenia and leukopenia in C57BL/6 mice

We conducted platelets and leukocytes counts in uninfected and *T. cruzi*-infected mice at 7, 12 and 21 days post-infection. C57BL/6 mice infected rapidly develop thrombocytopenia and leucopenia (day 12 pos-infection). This effect was found to be transient and independent of numbers of parasites used to infection (Fig. 1, $p = 0.001$ when compared with uninfected mice).

Immunization with *P. serpens* is able to increase in vivo survival of platelets in the early of *T. cruzi* infection

To determine whether immunization with *P. serpens* regulates in vivo clearance of platelets and leukocytes in the host infected with *T. cruzi*, C57BL/6 mice previously immunized were infected with trypomastigotes forms of *T. cruzi* (10^5 cells/mouse). Twelve days after infection, immunized mice displayed increased counts to platelets (Fig.2A, $p = 0.001$ when compared with control mice) and leukocytes (Fig.2B, $p = 0.001$ when compared with control mice).

Hyperimmune sera against *P. serpens* attenuates the effects of TS on platelets

TS (50 μ g) was injected intraperitoneally in mice (same rout of *T. cruzi* infection), as expected, a strong reduction (around 50%) in the normal platelet count was observed 24 h after TS injection (Fig. 3, $p < 0.05$). No effect was observed when TS inactive by heating was give. We did not observed changes in the leukocytes counts from mice inoculated with TS (data not shown). Furthermore, the

counts of megakaryocytes in the bone marrow were essentially unaltered (Fig. 4, $p > 0.05$).

To directly test whether protective immunity against *T. cruzi* provided by oral immunization with *P. serpens* is able to reduce the effects of TS on platelets, we tested whether the only immunization or antibodies present in sera from immunized animals also inhibit the activity of TS. As shown in Fig. 5, immunization with *P. serpens* attenuated the effects of TS on platelets. Sera of C57BL/6 mice immunized with *P. serpens* also inhibit the activity of entire TS (Fig.6A, $p < 0.05$). TS-neutralizing mouse monoclonal antibody (immunoglobulin IgG2b) was used as control (Fig 6B.)

DISCUSSION

During experimental infection of mice with *T. cruzi*, several hematologically abnormal parameters, including marked thrombocytopenia and leukopenia, are observed (Cardoso and Brener, 1980; Malvezi et al., 2004; Tribulatti et al., 2005). These alterations are transient (Cardoso and Brener, 1980) and can be prevented by trypanocidal drugs (Marcondes et al., 2000), but there is still no suitable molecular explanation for this.

T. cruzi is unable to synthesize sialic acids de novo (Frasch, 2000) but circumvents this limitation by expressing the enzyme *trans*-sialidase (TS), which is able to directly transfer (2, 3)-linked sialyl residues among glycoproteins or glycolipids (Schenkman et al., 1991). TS is anchored to the membrane by glycosylphosphatidylinositol (2, 3) and is shed into the surrounding environment, and it is detected in the blood of infected animals and human patients during the acute stage of the infection (de Titto and Araujo, 1988; Leguizamón et al., 1994). In

the C terminus, the enzyme has tandem repetitive amino acid units that allow it to persist in blood for at least 3 days (Buscaglia et al., 1999), which allows it to induce pathological disorders even far from the infectious foci or to act on the blood cells (de Titto and Araujo, 1988).

We have developed a model of infection with a *T. cruzi* Y strain strain in C57BL/6 and BALB/c mice, prototype hosts for the study of resistance and anemia in murine Chagas' disease (Malvezi et al., 2004; Hideko Tatakihara et al., 2008). *T. cruzi* infection with Y Strain in C57BL/6 mice (resistant type) resulted in a more severe anemia when compared to BALB/c (susceptible mice) (Malvezi et al., 2004). In this sense, we demonstrated that BALB/c immunized with *P. serpens* and later challenged with a lethal inoculum of *T. cruzi* trypomastigote forms showed a significant decrease in parasitemia and mortality (Breganó et al., 2003).

The fact that the protective mechanisms induced by the immunization with parasites non-pathogenic to vertebrates, such as phytomonads, are not fully known, there is a need to better understand the relationships between *P. serpens* and the development of anti-*T. cruzi* immunological responses (Santos et al., 2007).

P. serpens shares common antigens with *T. cruzi* (Breganó et al., 2003; Graça-de-Souza et al., 2010), but TS activity is absent (Medina-Acosta et al., 1994). Consequently, we extended the above investigation by examining the effects of protective immune response against *T. cruzi* induced by *P. serpens* on TS activity.

Previous reports indicated that TS from *T. cruzi* alters the platelet surface sialic acid content acting as a neuraminidase (Csete et al., 1985) and induces accelerated clearance of the platelets that leads to the thrombocytopenia observed during acute Chagas' disease (Tribulatti et al., 2005). We focused our analysis at 12

days post-infection (p.i), the period in which the TS activity is directly involved in the thrombocytopenia induced by *T. cruzi* (Tribulati et al., 2005).

In the murine *T. cruzi* infection model used in this study, we found that oral immunization with *P. serpens* was able to increase the survival of platelets and leukocytes in the early of *T. cruzi* infection and reduced TS activity in vivo. In addition, we found that a single i.p injection (same rout of infection with *T. cruzi*) of TS into naïve mice reduced the platelet count by 50%. As describe previously, TS has ability to disseminate systemically within the hosp and the blood and bone marrow are the main sites where the enzyme may act to reduce the platelet count (Tribulatti et al., 2005). We did not observed changes in the leukocytes and megakariocytes counts from mice inoculated with TS. These data indicate that TS not cause deleterious effect on the bone marrow and confirm the studies of Tribulatti et al., (2005).

As describe previously, *P. serpens* is highly immunogenic in mice and rabbits (Breganó et al., 2003) and sera from patients with Chagas' disease presented a strong reactivity with *P. serpens* antigens (Graça-de-Souza et al., 2010). Thus, we have shown that hyperimmune sera against *P. serpens* attenuates the effects of TS on platelets, suggesting that this inhibition was due to the presence in the sera of specific antibodies directed against the enzymatic domain of the protein since they also abolish the activity of a recombinant TS. In fact, mice infected with *T. cruzi* produce antibodies able to neutralize TS activity only if they survive the acute phase of infection (Leguizamón, et al., 1994). In accordingly, sera from chronic chagasic patients and rodents infected with *T. cruzi* inhibited TS by recognizing its amino-terminal and catalytic domain (Pereira-Chioccola et al., 1994). At present, we do not

know what domain of TS is recognized by sera obtained of immunized mice with *P. serpens* and investigation about this is currently under way in our laboratory.

In conclusion, our observations argue for efforts to a better understanding about pathogenesis during *T. cruzi* infection and claim that the use of the lower trypanomatids as a safer source of immunogenic agents for Chagas' disease. Therefore, more attention should be given to this plant trypanosomatid, which is useful not only as a model for the biochemical and immunological studies among the Trypanosomatidae family, but also as a candidate for vaccine studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Paulo M. F. Araujo from the State University of Campinas, Brazil for providing T. cruzi (Y Strain), Adernal dos Santos for maintaining the colonies of C57BL/6 mice with competence and enthusiasm and Ediel Clementino da Costa for technical support. This work was supported by grants from Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq, 471854/08-5) and Fundação Araucária. Rosiane V. da Silva was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship.

REFERENCES

Bregano, J.W., Picão, R.C., Graça, V.K., Menolli, R.A., Jankevicius, S.I., Pinge-Filho, P., Jankevicius, J.V., 2003. *Phytomonas Serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *Fems. Immunol. Med. Microb.* 39 (3), 257-264.

Buscaglia, C.A., J. Alfonso, O. Campetella, A.C. Frasch. 1999. Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the halflife of proteins in blood. *Blood* 93, 2025–2032.

Camargo, E.P., 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv. Parasitol.* 42, 29-112.

Camargo, E.P., Kastelein, P., Roitman, I., 1990. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitol. Today.* 6, 22-25.

Cardoso, J.E., Brener, Z., 1980. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 75, 97- 104.

Cluster, S., 2002. Biology of anemia, differential diagnosis, and treatment options in human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 185 (Suppl 2), S105-9.

Csete, M., Lev, B. I., Pereira, M.E., 1985. An influenza virus model for *Trypanosoma cruzi* infection: interactive roles for neuraminidase and lectin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 117, 153–165.

Dacie, J.V.; Lewis, S.M. 1994. Basics haematological techniques. In: *Practical haematology*. Edinburg, Churchill Livingstone.

De Titto, E.H., Araujo, F.G., 1988. Serum neuraminidase activity and hematological alterations in acute human Chagas' disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 46,157–161.

Dollet, M., 1984. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*), *Annu. Rev. Phytopathol.* 22,115- 132.

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

Gonçalves, C.C., Reiche, E.M., de Abreu Filho, B.A., Silveira, T.G., Felizardo, T.C., Maia, K.R., Costacurta, R., Padovesi, E.J., Dias Filho, B.P., Jankevicius, S.I., Jankevicius, J.V., 2002. Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (1), 91-102.

Graça-de Souza, V.K., Monteiro-Góes, V., Manque, P., Souza, T.A., Corrêa, P.R., Buck, G.A., Ávila, A.R., Yamauchi, L.M., Pinge-Filho, P., Goldenberg, S., Krieger, M.A.,

Yamada-Ogatta, S.F., 2010. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas Serpens*. Biol. Res. 43(2), 233-41.

Harlow, E., Lane, D., 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hideko Tatakihara, V.L., Cecchini, R., Borges, C.L., Malvezi, A.D., Graça-de-Souza, V.K., Yamada-Ogatta, S.F., Rizzo, L.V., Pinge-Filho, P., 2008. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. Fems. Immunol. Med. Microbiol. 52(1), 47-58.

Ikebe, B.O., Lule, M., Terry, R.J., 1977. Anemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice with *Trypanosoma congolense* or *Trypanosoma brucei*. Act. Trop. 34, 53-60.

Jankevicius, J.V., Jankevicius, S.I., Campaner, M., Conchon, I., Maeda, L.A., Teixeira, M.M.G., Freymuller, E., Camargo, E.P., 1989. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes, J. Protozool. 36, 265- 271.

Junqueira, C., Caetano, B., Bartholomeu, D.C., Melo, M.B., Ropert, C., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., 2010. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas Disease. Expert. Rev. Mol. Med. 15, 12-29.

Leguizamón, M.S., Campetella, O.E., González, Cappa, S.M., Frasch, A.C., 1994. Mice infected with *Trypanosoma cruzi* produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity. *Infect Immun.* 62(8), 3441-3446.

Lopez, J.D.; Caulada, Z.; Barbieri, C.L.; Camargo, E.P., 1981. Cross- reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(6): 1183-8.

Lopez, M., Huynh, C., Andrade, L.O., Pypaert, M., Andrews, N.W., 2002. Role of sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Mol Biochem. Parasitol.* 119, 141- 145.

Malvezi, A.D., Cecchini, R., Souza, F., Tadokoro, C.E., Rizzo, L.V., Pinge-Filho, P., 2004. Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Fems. Immunol. Med. Microbiol.* 41, 69-77.

Marcondes, M.C., Borelli, P., Yoshida, N., Russo, M., 2000. Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: Reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect.* 2(4), 347-352.

Mcghee, R.B., Cosgrove, W.B., 1980. Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbial. Rev.* 44, 140- 173.

Medina-Acosta, E., Franco, A.M.R., Jansen, A.M., Sampol, M., Neves, N., Pontes-de-Carvalho, L., Grimaldi, G., Jr., Nussenzweig, V., 1994. Trans-sialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable trypanosomatids. *Eur. J. Biochem.* 225, 333-339.

Moncayo, A., Ortiz Yanine, M.I., 2006. An update on Chagas disease (human american trypanosomiasis). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100 (8), 663-677.

Paul, R.E., Brey, P.T., 2003. Malaria parasites and red blood cells: from anaemia to transmission. *Mol. Cells.* 15(2), 139-149.

Pereira-Chioccola, V.L., Schenkman, S., Kloetzel, J.K., 1994. Sera from chronic chagasic patients and rodents infected with *Trypanosoma cruzi* inhibit trans-sialidase by recognizing its amino-terminal and catalytic domain. *Infect. Immun.* 62(7), 2973-2978.

Pinge-Filho, P., Peron, J.P.S., Moura, T.R., Menolli, R.A., Graça, V.K., Estevão, D., Tadakoro, C.E., Jankevicius, J.V., Rizzo, L.V., 2005. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Imunol. Letters* 96, 283-290.

Rassi, A. Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375 (9723), 1388-1402.

Repka, D., Rangel, H.A., Atta, A.M., Gavino, V.A., Piedrabuena, A.E., 1985. Experimental Chagas disease in mice infected with one LD⁵⁰ of parasite. *Rev. Bras. Biol.* 45, 309–316.

Ribeirão, M., Pereira-Chioccola, V.L., Eichinger, D., M., Schenkman, S., 1997. Temperature differences for trans-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Glycobiology*. 7 (8), 1237-1246.

Santiago, H.C., Feng, C.G., Bafica, A., Roffe, E., Arantes, R.M., Cheever, A., Taylor, G., Vieira, L.Q., Aliberti, J., Gazzinelli, R.T., Sher, A., 2005. Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth. *J. Immunol.* 175(12), 8165-8172.

Santos A.L., D'ávila-Levy, C.M., Elias, C.G., Vermelho, A.B., Branquinha, M.H., 2007. *Phytomonas serpens*: Immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes Infect.* 9, 915-921.

Soares, M.B., Santos, R.R., 2009. Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104, 325-332.

Schenkman, S., Jiang, M.S., Hart, G.W., Nussenzweig, V., 1991. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* 65(7), 1117-1125.

Silva, L.H.P., Nussenweig, V., 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folha Clin. Biol.* 20,191- 207.

Stuart K, Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R., 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* 118(4), 1301–1310.

Tribulatti, M.V., Mucci, J., Rooijen, N.V., Leguizamón, M.S., Campetella, O., 2005. The trans-sialidases from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect. Immun.* 73, 201-207.

Vickerman, K., 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates, *Int. J. Parasitol.* 24, 1317- 1331.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Experimental *T. cruzi* infection induces thrombocytopenia and leukopenia transientes in the early of infection. (A) Platelets and (B) leukocytes were counts from perpheral blood from uninfected and infected mice. (a-b) Groups of C5BL/6 were infected with 5×10^3 trypomastigotes (Y strain), (c-d) C5BL/6 mice were infected with 10^5 trypomastigotes (Y strain). All cell counts were performed 7, 12 or 21 days post-infection. Values represent the mean \pm SE and are representative of two independent experiments, using 4-15 mice per group. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons test. *Significantly different ($p < 0.001$) when compared with control group (non-infected).

Figure 2. Oral immunization of C57BL/6 mice attenuates thrombocytopenia) and leukopenia after *T. cruzi* infection. Mice received by gavage 2×10^8 living *P. serpens* parasites four times at weekly intervals and an i.p. challenge 1 week later with 10^5 blood trypomastigotes by route i.p. Whole blood samples were collected on day 12 after infection. (A) Platelets counts and (B) Leukocytes counts. Values represent the mean \pm SE and are. representative of two independent experiments, using 12 mice per group. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons test. *Significantly different ($p < 0.001$) when compared with control group (non-infected). **Significantly different ($p < 0.05$) when compared with group (infected).

Figure 3. TS induces thrombocytopenia in naïve C57BL/6 mice. Mice were inoculated i.p with 50µg of recombinant TS. Platelets counts were determined 24 h later. Values represent the mean ± SE and are representative of two independent experiments, using 12 mice per group Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons test. *Significantly different ($p < 0.05$) when compared with control group (non-infected).

Figure 4. TS not induces alterations in megakariocyte counts. Mice received by gavage 2×10^8 living *P. serpens* parasites four times at weekly intervals and an i.p. 1 week later the mice were inoculated i.p with 50 µg of recombinant TS. Megakariocyte counts were determined 24 h later. Values represent the mean ± SE and are representative of two independent experiments, using 12 mice per group Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons test. *Significantly different ($p < 0.05$) when compared with control group (non-infected).

Figure 5. Oral immunization of C57BL/6 mice reduces thrombocytopen induced by recombinant TS injection. Mice received by gavage 2×10^8 living *P. serpens* parasites four times at weekly intervals and an i.p. challenge 1 week the mice were inoculated i.p with 50 µg of recombinant TS. Values represent the mean ± SE and are representative of two independent experiments, using 7-10 mice per group. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons test. *Significantly different ($p < 0.001$) when compared with control group (non-infected).

Figure 6. Administration of sera from C57BL/6 mice immunized with *P. serpens* or administration of monoclonal antibody anti-TS inhibit the activity of TS on platelets. Mice received by gavage 2×10^8 living *P. serpens* parasites four times at weekly intervals. Recipients were injected i.p with 50 μg of enzyme in 0.1 ml of PBS. Control mice received PBS alone. Mice received a single dose (0.1 ml) of immune sera anti-*P. serpens* (A) or mAb 39 (B) mixed with purified TS (50 μg) at 15 min at room temperature. Platelet counts were determined 24 h later. Values represent the mean \pm SE and are representative of two independent experiments, using 7-10 mice per group. Results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparisons test. *Significantly different ($p < 0.05$) when compared with control group (without TS).

FIGURES

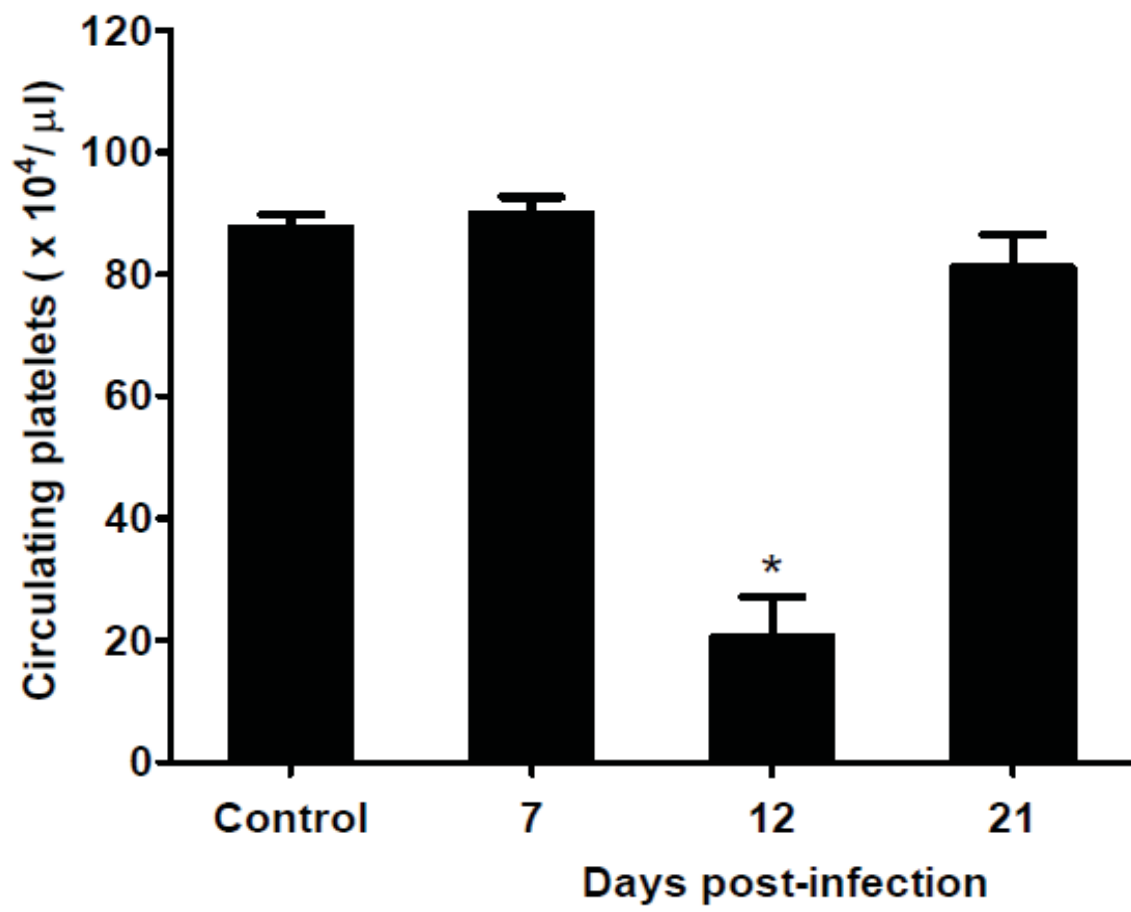


FIG. 1A

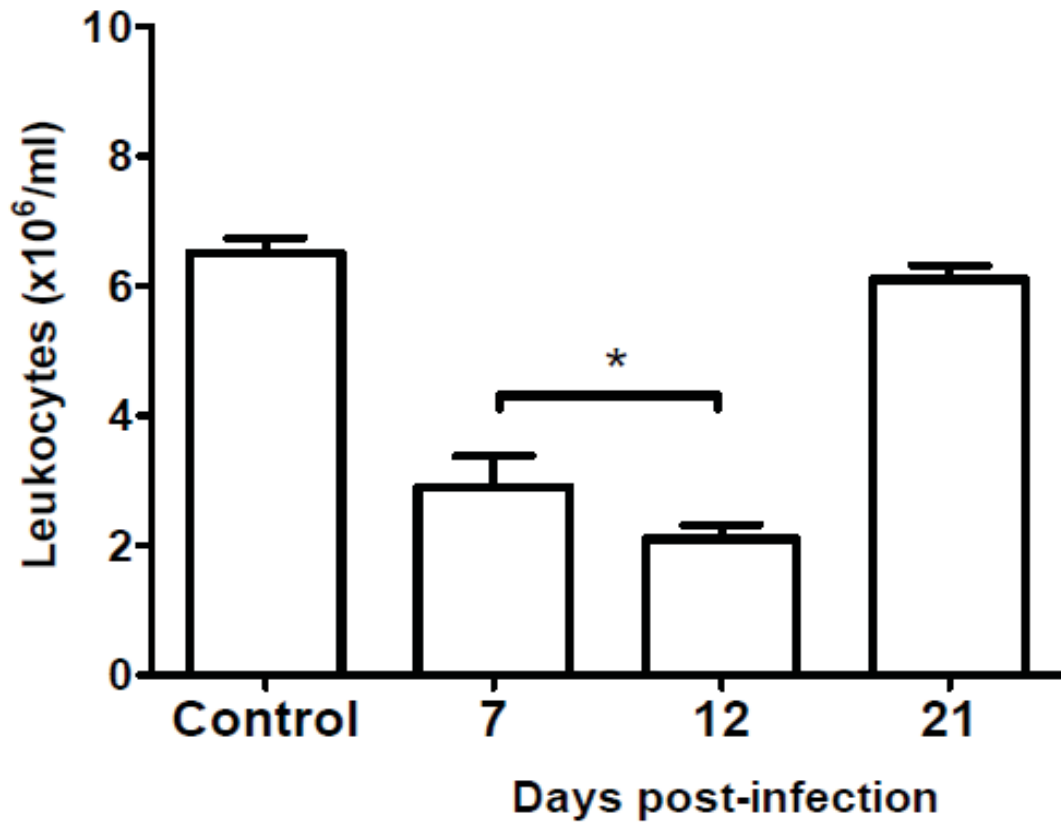


FIG. 1B

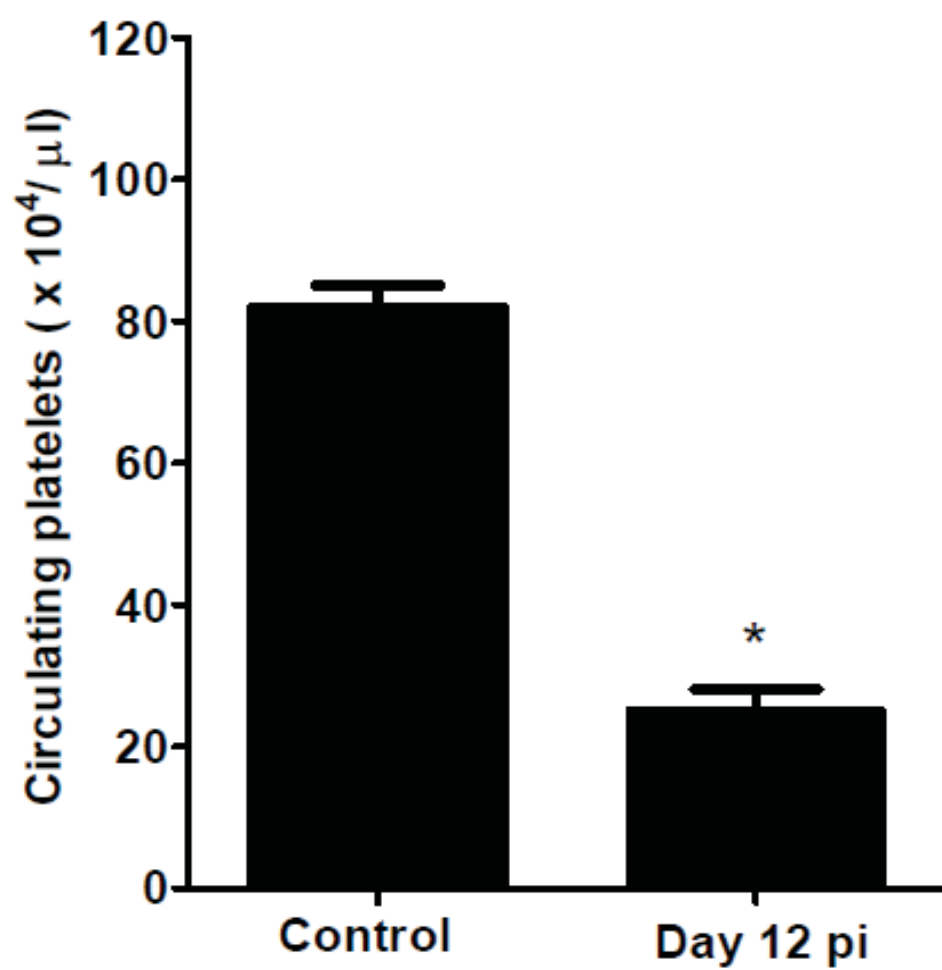


FIG. 1C

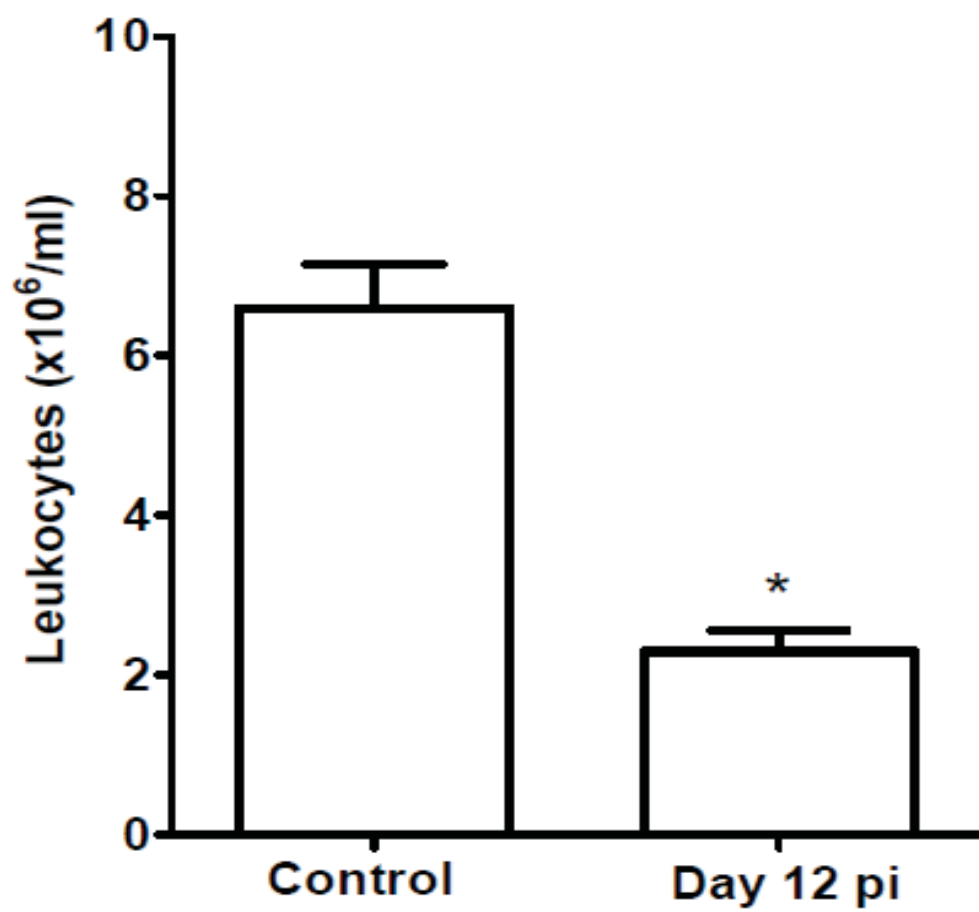


FIG. 1D

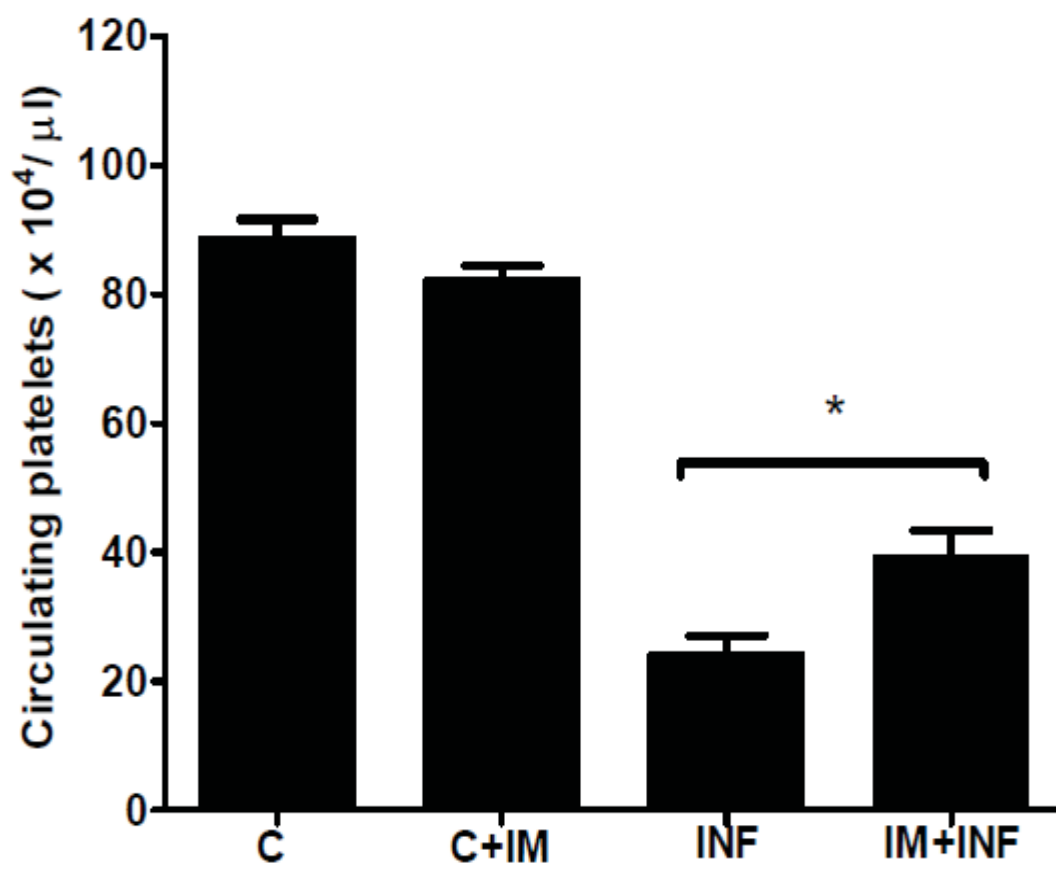


FIG.2 A

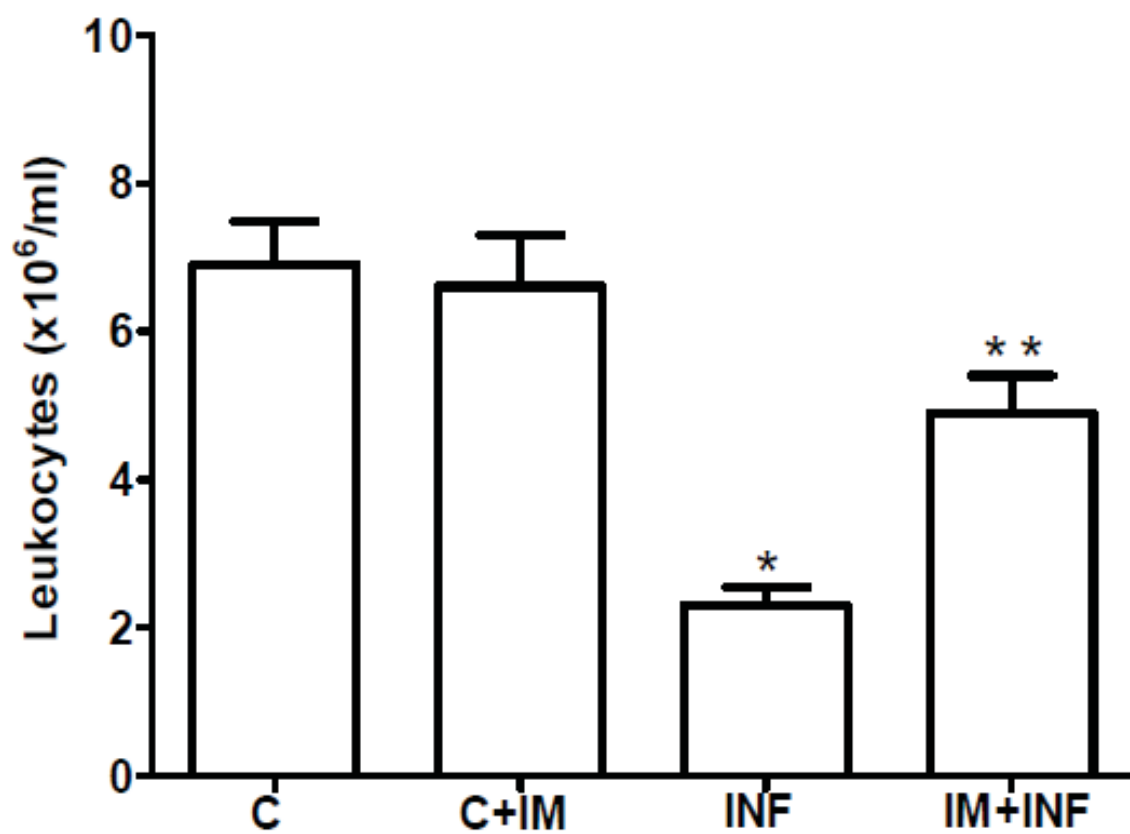


FIG.2B

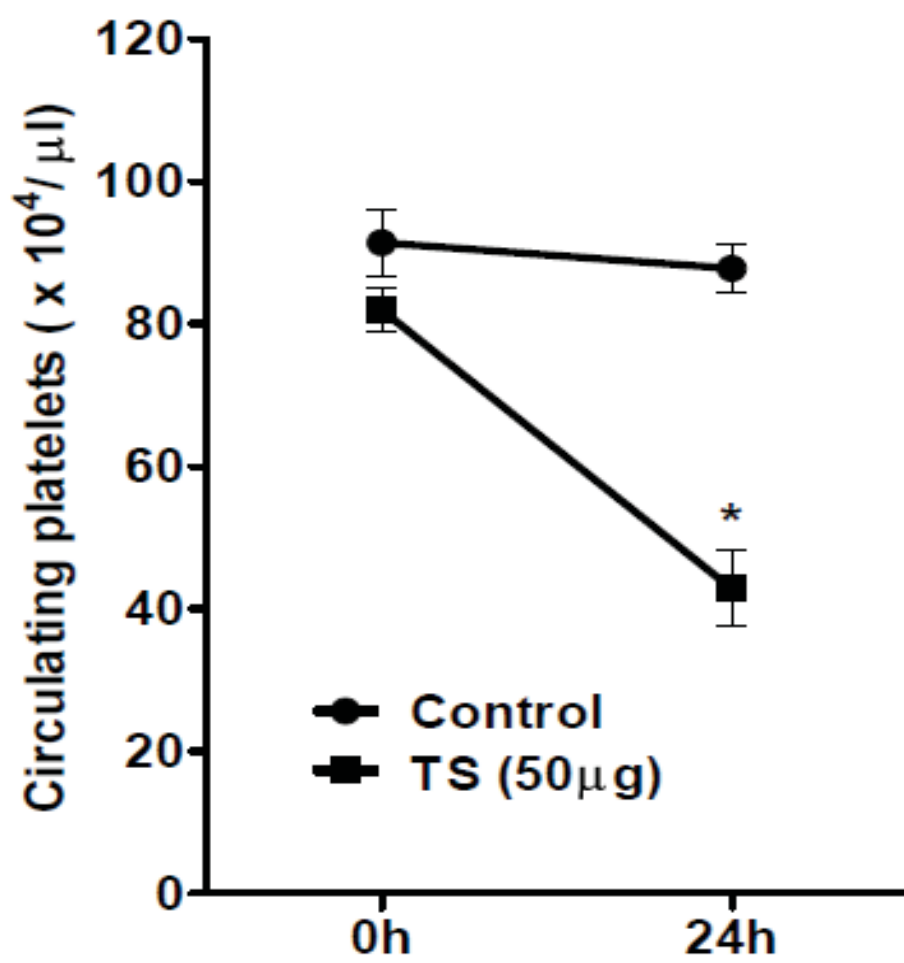


FIG. 3

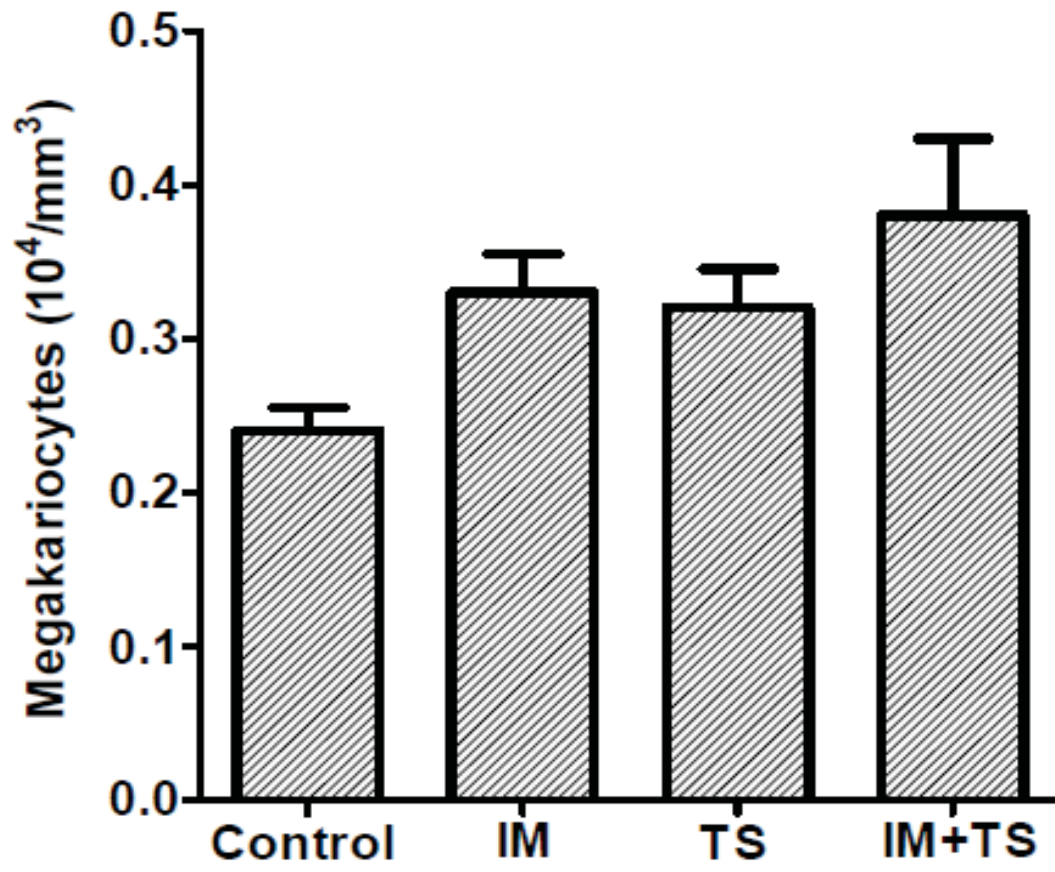


FIG. 4

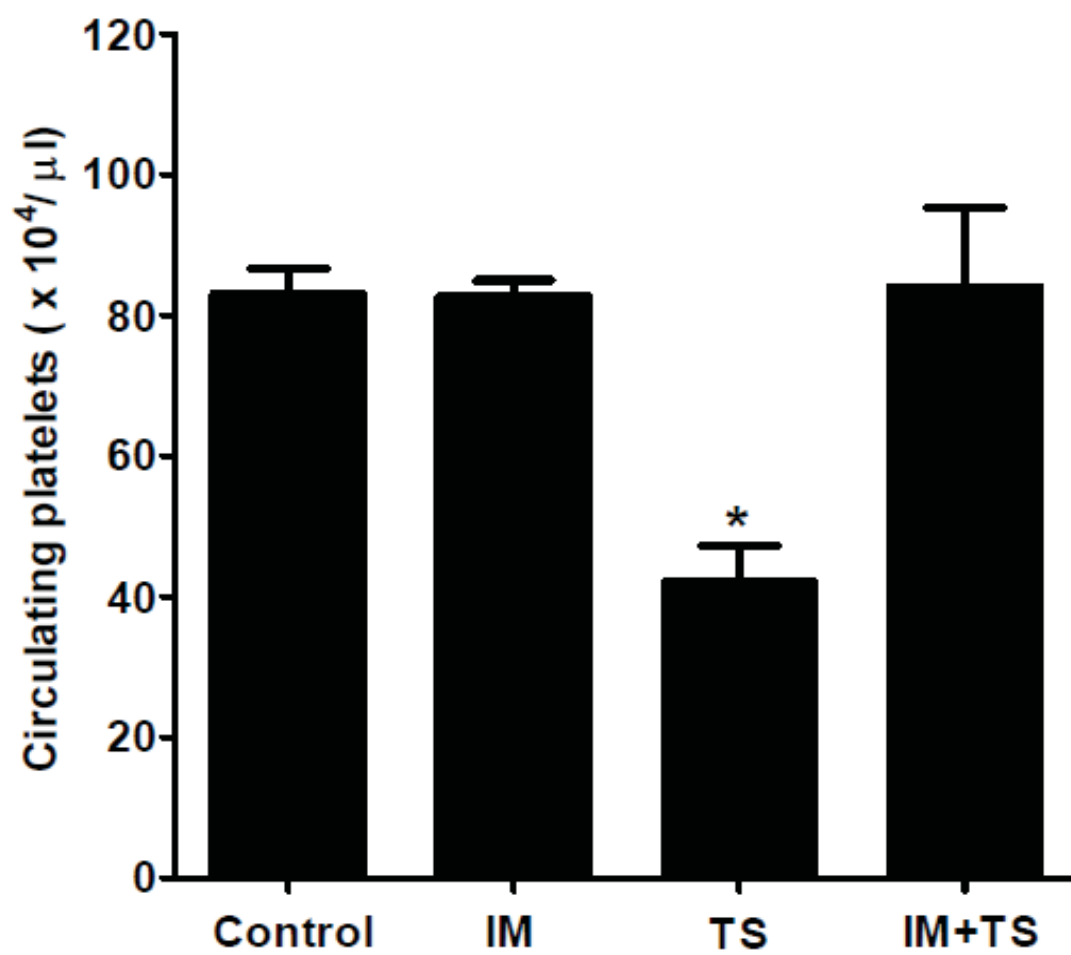


FIG. 5

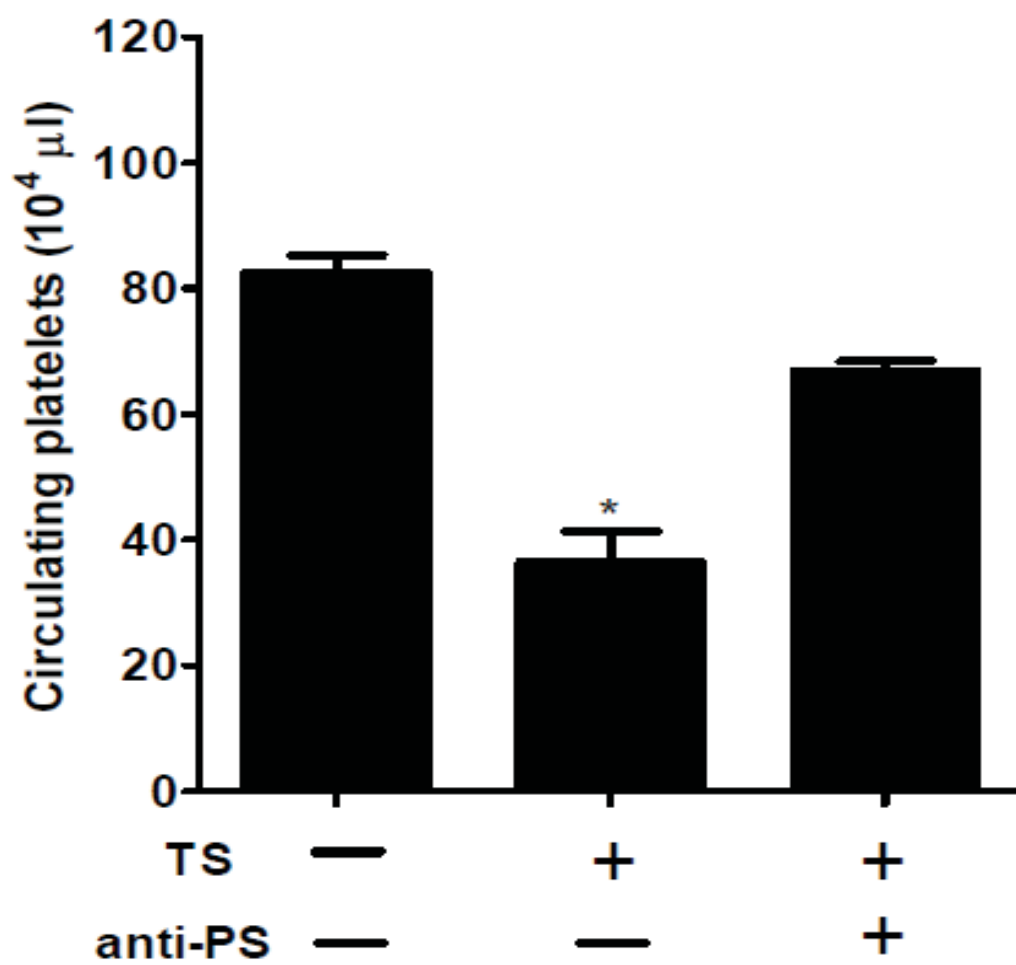


FIG. 6 A

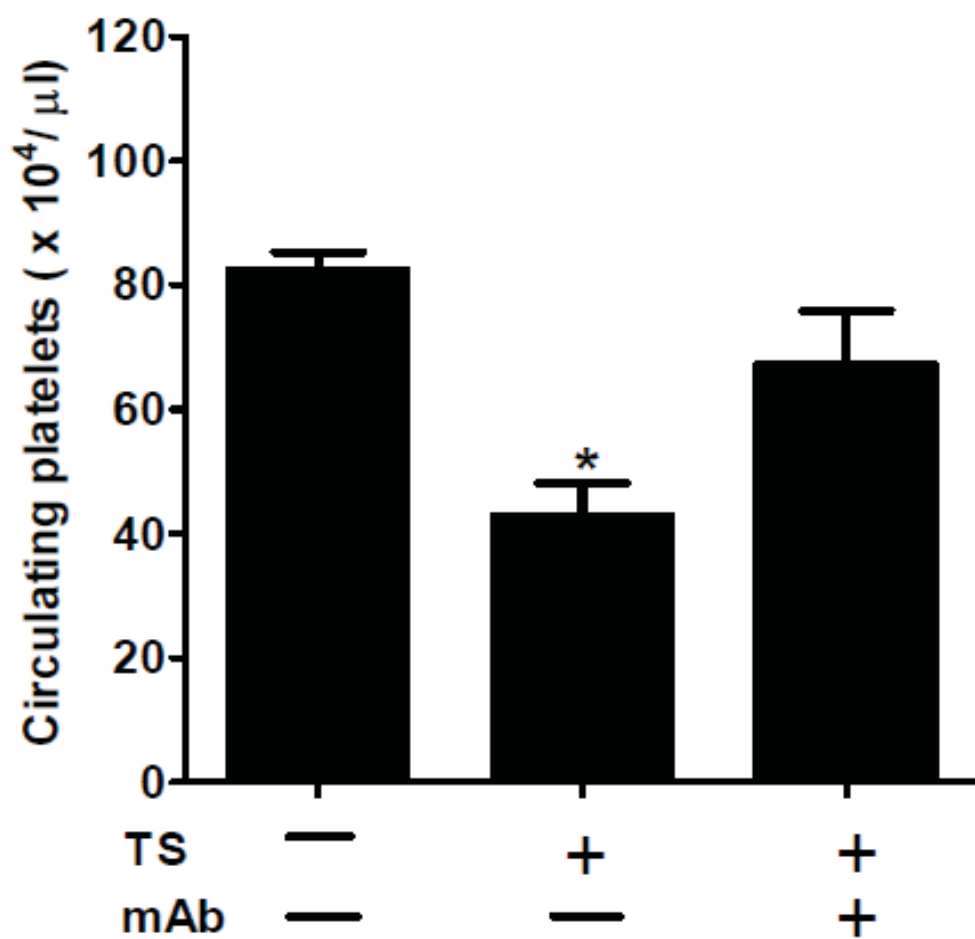


FIG. 6 B