Rafael Moysés Salgado

Avaliação do papel do soro imune de camundongos CD28KO (deficiente em IgG especifica) na interação *in vivo* e *in vitro* do *T. cruzi* Sylvio X10/4 com células da linhagem macrofágica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

Rafael Moysés Salgado

Avaliação do papel do soro imune de camundongos CD28KO (deficiente em IgG especifica) na interação *in vivo* e *in vitro* do *T. cruzi* Sylvio X10/4 com células da linhagem macrofágica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Salgado, Rafael Moysés.
Avaliação do papel do soro imune de camundongos CD28KO (deficiente em IgG específica) na interação in vivo e in vitro do *T. cruzi* Sylvio X10/4 com células da linhagem macrofágica / Rafael Moysés Salgado. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia da doença de Chagas experimental.

Versão do título para o inglês: In vivo na in vitro role of immune serum CD28KO mice (deficient in specific IgG) in the interaction of *T. cruzi* Sylvio X10/4 parasite with cells of the macrophage lineage.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Anticorpos 3. Macrófagos 4. CD28
5. IgM 6. Doença de Chagas I. Mosig, Prof. Dr. José Maria Alvarez
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0214/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Moysés Salgado.

Título da Dissertação: Avaliação do papel do soro imune de camundongos CD28KO (deficiente em IgG específica) na interação in vivo e in vitro do *T. cruzi* Sylvio X10/4 com células da linhagem macrofágica.

Orientador(a): Prof. Dr. José Maria Álvarez Mosig.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cepo@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **140** nas fls. **94** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Maria Álvares Mosig, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi clone Sylvio X10/4: Mecanismos envolvidos no controle do parasita e na patologia cardíaca crônica** do qual participam o(s) alunos **André L.Bombeiro, Christian E. Jorquera-Rosas, Giovana Giacomini, Rafael Moyses Salgado,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **23.11.2010, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário-suplente
CEUA – ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 089.13

São Paulo, 31 de outubro de 2013.

REF.: Protocolo nº 140/10.

"*A infecção murina pelo Trypanosoma cruzi clone Sylvio X10/4: Mecanismos envolvidos no controle do parasita e na patologia cardíaca crônica*"

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 15.11.2016.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

p/ Bunes

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. José Maria Álvares Mosig
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos derramadas, oportunidades, batalhas vencidas e também, a todos os obstáculos e dificuldades, pois em nenhum momento, Ele permitiu que minha fraqueza me dominasse.

É simplesmente impossível traduzir em palavras, a gratidão que possuo pela minha família, meu porto seguro, meu alicerce, minha paz. Em nenhum momento, existiram dúvidas de que eu seria capaz de concluir o que desejava e exatamente por isso, me apoiaram em todos os sentidos possíveis. Osni e Rita, muito obrigado por serem meu exemplo e minha força. Matheus, por ser meu irmão e companheiro. Daniel, por ter sido este sopro de vida e doçura na nossa família. Creuza, minha avó querida, que me mima de todas as maneiras imagináveis. Também não posso deixar de agradecer, a todo resto da família, que não foram menos essenciais nessa conquista.

Agradeço a Daniella Bucci, um anjo que me concedeu a possibilidade de começar a sonhar com esta realidade. Fez muito mais do que o simples papel de professora, e me apresentou ao mundo da ciência, e me deu esta oportunidade da qual posso me orgulhar hoje.

Ao meu orientador José Maria Álvarez Mosig (Pepe) por ter aberto as portas e apostado em alguém que nem tinha ideia do que era pesquisa. E ter tido paciência e investido com afinco em meu progresso.

Aos professores colaboradores, Maria Regina D´Império Lima e Sabrina Epiphanio pelo suporte nos experimentos.

Aos professores da banca de qualificação, Hiro Goto, Cláudio Marinho e Beatriz Stolf pela contribuição para a finalização deste trabalho.

Aos grandes amigos que apesar de quase não saberem ou entenderem um terço do que realmente faço, sempre foram presentes e cada momento com eles, era um prazer, um ponto de restauração, um novo fôlego para seguir em frente. È

difícil não citar o nome de todos, mas em especial, não posso deixar de lembrar, Fernando e Rafael, irmãos que tive o prazer de escolher.

Aos amigos do laboratório “ao lado”, Érika Salles, Sheyla Castillo, Maria Menezes, Henrique Borges, Genoilson Alves, Letícia Sarturi, Fernanda Sakurai, Alexandra Cassado, Caio Bonfim, Rosana Pereira e Flávia Sarmento, por toda a troca de conhecimento, e a criação de um ambiente agradabilíssimo de trabalho. Em especial, ao Eduardo Pinheiro Amaral, que além de todo o apoio cientifico, tornou-se mais um irmão que levarei para toda a vida.

Aos amigos do laboratório “mais ao lado ainda”, Luana Ortolan, Michelle Sercundes, Daniela Debone, Leandro Gustavo. Em especial, a Keitty Pereira, por todo o companheirismo e força durante o inicio desta caminhada, aumentando a cada dia essa amizade.

Aos amigos do laboratório, Christian Jorquera Rosas, Beatriz Villas Bôas, Raíssa Fonseca e Giovana Giacomini. Em especial, as meninas, que se tornaram grandes amigas e companheiras, na carreira cientifica e na vida, a presença delas fez e faz toda a diferença.

Ao apoio técnico de Mariana Franchi, Jéssica Cardoso e Áurea. Em especial, ao Rogério, que me ensinou grande parte do que sei, e que além do excelente suporte técnico, se demonstrou um grande parceiro e amigo.

Finalmente agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

A melhor forma de agradecer apoio é demonstrar o quanto este carinho nos impulsiona a ser melhores. E essa história não termina aqui por isto.

Serei eternamente grato a todos!

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, com o auxílio fincanceiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

“Sonhar, viver, e todo dia agradecer...

E rezar pra você ser a última a morrer, esperança”.

(Música: Esperança / Banda: Aliados / Compositor: Dudu Golzi)

RESUMO

SALGADO, R. M. **Avaliação do papel do soro imune de camundongos CD28KO (deficiente em IgG especifica) na interação *in vivo* e *in vitro* do *T. cruzi* Sylvio X10/4 com células da linhagem macrofágica**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Fagócitos mononucleares possuem papel fundamental no controle da infecção por *T. cruzi*. A interação entre tripomastigotas de *T. cruzi* com anticorpos e/ou moléculas do sistema complemento facilita a internalização dos mesmos pelos macrófagos. Estudos prévios demonstraram a importância da IgG especifica na remoção do *T. cruzi* da circulação sanguínea, promovendo a internalização por fagócitos mononucleares. No entanto, o papel da IgM especifica na remoção do parasita não tem sido estudada. Nesse trabalho, nós analisamos o papel *in vivo* e *in vitro* de soro de camundongo CD28KO infectado (que apresenta exclusivamente anticorpos *T. cruzi*-específicos da classe IgM) na "remoção" de parasitas Sylvio X10/4, clone miotrópico de *T. cruzi* que não apresenta parasitemia patente em camundongos normais. Tripomastigotas Sylvio X10/4 isolados de cultura celular ou do sangue de camundongos RAG2KO infectados desaparecem da circulação uma hora após inoculação intravenosa (iv) em camundongos C57BL/6. A análise destes camundongos 24 horas após a inoculação revela maior concentração de RNA e parasitas viáveis no fígado e baço, resultado que sugere a remoção do parasita, considerando o sabido miotropismo do clone Sylvio X10/4. Depleção *in vivo* de macrófagos e células dendriticas pelo tratamento com lipossoma de clodronato estende o tempo dos parasitas na circulação sanguínea, demonstrando a importância destas células na remoção espontânea deste parasita. Dada esta saída espontânea, decidimos estudar a remoção imune (por anticorpos) de parasitas Sylvio X10/4 no sexto dia de infecção, quando a parasitemia subpatente apresenta um aumento significante. Para isso, camundongos C57BL/6 foram inoculados iv, no quarto dia pós-infecção, com soro de camundongo normal (NMS), soro imune de camundongos C57BL/6 (B6-IMS, que contém IgM e, principalmente, IgG específicas) ou soro imune de camundongos C57BL/6 CD28KO (CD28KO-IMS, que contem exclusivamente IgM especifica).. Os níveis de parasitemia subpatente foram analisados em dias subsequentes por cultura em meio L.I.T. Camundongos tratados com B6-IMS apresentaram maior remoção de parasitas sanguíneos comparados aos camundongos tratados com NMS. Não menos importante, CD28KO-IMS também se mostrou eficiente na remoção do *T. cruzi*, contudo com atividade menor que a de B6-IMS. Resultados concordantes foram observados no estudo *in vitro* da invasão de parasitas Sylvio X10/4 em macrófagos derivados da medula óssea ou elicitados do peritônio, onde o número de amastigotas no interior dos macrófagos aumentou não somente na presença de B6-IMS, mas também na presença de CD28KO-IMS. O conjunto dos resultados apresentados indica que os macrófagos são elementos essenciais na remoção de *T. cruzi*, e que esta atividade pode ser aumentada não somente por anticorpos IgG específicos, mas também por soro de camundongo CD28KO infectado, que contém exclusivamente anticorpos específicos da classe IgM.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Anticorpos. Macrófagos. CD28. IgM. Doença de Chagas.

ABSTRACT

SALGADO, R. M. ***In vivo* and *in vitro* role of immune serum from CD28KO chronic mice (deficient in specific IgG) in the interaction of *T. cruzi* Sylvio X10/4 parasites with cells of the macrophage lineage.** 2013. 67 p. Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Mononuclear phagocytes play a fundamental role in controlling infection by *T. cruzi*. The interaction between trypomastigotes with specific antibodies and / or molecules of the complement system facilitates the parasite internalization of these by macrophages. Previous studies have demonstrated the importance of specific IgG in the removal of *T. cruzi* from blood circulation, promoting the internalization by mononuclear phagocytes. However, the role of specific IgM in removing the parasite has not been studied. In this study, we analyze the role *in vivo* and *in vitro* role of serum from *T. cruzi* chronically-infected CD28KO mice (in which the parasite - specific antibody response is restricted to the IgM class) in the "clearance" of Sylvio X10/4 parasites, a myotropic clone of *T. cruzi*, which does not yield patent parasitemias in normal mice. Trypomastigotes isolated from cell culture disappear from circulation one hour after intravenous inoculation (i.v.) in C57BL/6 mice. The analysis of these mice 24 hours after inoculation revealed a greater concentration of *T. cruzi* RNA in the liver and spleen, a result that suggests the removal of the parasite, considering the known myotropism of clone Sylvio X10/4. *In vivo* depletion of macrophages and dendritic cells by treatment with clodronate liposome extends the time of the parasites in the bloodstream, demonstrating the importance of these cells in the spontaneous removal of this parasite. Given this spontaneous exit, we decided to study the immune removal (antibodies) of Sylvio X10/4 parasites on the sixth day of infection, when subpatent parasitemia shows a significant increase. For this purpose, C57BL/6 mice were inoculated i.v. on day 4 post-infection with normal mouse serum (NMS) , immune serum of C57BL/6 (B6-IMS - containing IgM and especially specific IgG) or immune serum from C57BL / 6 mice CD28KO (CD28KO-IMS, which contains exclusively IgM specific antibodies). The levels of subpatent parasitemia were analyzed by culture in subsequent days in LIT medium. B6 mice treated with B6-IMS had higher blood removal of parasites compared to mice treated with NMS. Not least, CD28KO-IMS was also efficient in the removal of *T. cruzi*, although less than B6-IMS. Concordant results were observed in *in vitro* invasion studies of bone marrow-derived and peritoneum-elicited macrophages by Sylvio X10/4 parasites, where the number of amastigotes inside macrophages increased not only in the presence of B6-IMS, but also in the presence of CD28KO-IMS. Our results indicate that macrophages are essential for the removal of *T. cruzi*, and that this activity can be increased not only by specific IgG antibodies, but also by serum from CD28KO infected mice, which exclusively contains specific IgM antibodies.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Antibodies. Macrophages. CD28. IgM. Chagas disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Quantificação de anticorpos no soro de camundongos WT e CD28KO selvagens ou cronicamente infectados pela técnica de ELISA. 35

Figura 2 - Carga parasitária no baço, fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 inoculados iv com diferentes soros. 36

Figura 3 - Parasitemia patente de animais não tratados e animais depletados de macrófagos e células dendríticas. 37

Figura 4 - Parasitemia subpatente (5 μl) de animais não tratados e tratados com lipossoma de clodronato.. 38

Figura 5 - Parasitemia subpatente (5 μl) e Score de animais não tratados e animais tratados com lipossoma de clodronato... 39

Figura 6 - Parasitemia patente e subpatente de animais C57BL/6 infectados com $5x10^4$ parasitas Sylvio X10/4 pela via endovenosa... 40

Figura 7 - Análise da parasitemia subpatente de animais tratados com soros crônico de camundongos WT ou CD28KO... 42

Figura 8 - Análise de parasitemia subpatente de animais tratados com soro crônico de camundongos WT ou CD28KO, estimadas na terceira leitura 43

Figura 9 - Análise de parasitemia subpatente de animais tratados com soro controle, ou soro crônico de camundongos WT ou CD28KO 44

Figura 10 - Análise de parasitemia subpatente de animais tratados com soro controle, ou soro crônico de camundongos WT ou CD28KO 45

Figura 11 - Carga parasitária no baço, fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 infectados e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção 46

Figura 12 - Quantificação relativa de *T. cruzi* (PCR Real time) de camundongos C57BL/6 infectados e tratados no 4º dia de infecção (relativo ao pulmão) 47

Figura 13 - Quantificação relativa de *T. cruzi* (PCR Real time) de camundongos C57BL/6 infectados e tratados no 4º dia de infecção (relativo ao soro controle) 48

Figura 14 - Análise por ELISA da reatividade frente a antígeno de *T. cruzi* das cepas Sylvio X10/4 e Y em pools de soros 49

Figura 15 - Curvas de parasitemia patente em animais inoculados i.v. com parasitas da cepa Y livres de anticorpos.. 50

Figura 16 - Caracterização da infecção em diferentes proporções parasita-macrófago (diferenciados a partir de precursores da medula óssea)..... 51

Figura 17 - Papel dos soros de camundongos WT e CD28KO crônicos na internalização e sobrevivência dos parasitas Sylvio X10/4 em macrófagos derivados da medula óssea.. 52

Figura 18 - Quantificação de óxido nítrico por Reagente de Griess em sobrenadantes de culturas de macrófagos diferenciados da medula óssea. 53

Figura 19 - Papel dos soros de camundongos WT e CD28KO crônicos na internalização e sobrevivência dos parasitas em macrófagos peritoneais 54

Figura 20 - Participação do sistema do complemento: Internalização e sobrevivência de parasitas Sylvio X10/4 em macrófagos 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B6-IMS: normal mouse serum (soro de camundongo selvagem).

BMDM: do inglês “bone-marrow-derived-macrophages” (macrófagos derivados da medulla óssea).

CD: Grupos de Diferenciação (Cluster of Differentiation).

CD28KO-IMS: do inglês *CD28KO ”immune mouse serum”* (soro imune de camundongo CD28KO).

cDNA: do inglês “*complementary deoxyribonucleic acid”* (ácido desoxirribonucleico complementar).

CML: do inglês “*complement mediated lysis”* (lise mediada por complemento).

CRIT: do inglês “*complement C2 receptor inhibitor trispanning”* (inibidor do receptor do complemento C2).

CRP: do inglês “*complement regulatory protein”* (proteína regulatória do complemento).

ELISA: do inglês “Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay” (ensaio imunoenzimático).

FcR: do inglês “*Fragment crystallizable receptor*” (receptor para o fragmento cristalizável).

i.v.: via intravenosa.

Ig: imunoglobulina.

IL: interleucina.

INF-y: do inglês, “interferon-gamma”.

iNOS: do inglês “*inducible nitric oxide synthase* (indutor da síntese de óxido nítrico).

ITAM: do inglês “i*mmunoreceptor tyrosine-based activation motif*“ (motives de ativação baseados em tirosina do imunoreceptor).

LIT: do inglês *“liver infusion tryptose”.*

LLCMK2: do inglês “*Rhesus Monkey Kidney Cell Line”.*

M-CSF: do inglês “*macrophage colony-stimulating factor”* (fator estimulador de colônia de macrófagos).

NK: do inglês, “natural killer”.

NLR: do inglês “nod-like receptors” (receptor do tipo Nod).

NMS: do inglês “*normal mouse serum”* (soro de camundongo selvagem).

NO: do inglês *“nitric oxide”* (óxido nítrico).

Nod: do inglês "*nucleotide-binding oligomerization domain"* (domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos).

OMS: Organização Mundial da Saúde.

p.i.: pós infecção.

PBS: do inglês "*Phosphate Buffered Saline"* (tampão fosfato salino)

PRR: do inglês "pattern recognition receptors" (receptores de reconhecimento de padrões).

qRT-PCR: do inglês, *"real-time reverse transcription polymerase chain reaction"* (transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase em tempo real).

RNA: do inglês "ribonucleic acid" (ácido ribonucleico).

SFB: soro fetal bovino.

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi.*

TcCRT: calreticulina.

T-DAF: do inglês "trypomastigote decay-accelerating factor" (fator de aceleração de decaimento em tripomastigotas).

TLR: do inglês "*toll-like receptor* "(receptor do tipo toll).

TNF: fator de necrose tumoral.

WT: do inglês "wild type".

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 Doença de Chagas 18
1.2 Ciclo e diversidade do *Trypanosoma cruzi* 19
1.3 Resposta imune ao *T. cruzi* 20
1.3.1 Escape do T. cruzi ao sistema do complemento 21
1.3.2 Papel dos anticorpos específicos na fagocitose de T. cruzi 24
2 OBJETIVOS 27
2.1 Objetivo Geral 27
2.2 Objetivos Específicos 27
3 MATERIAIS E MÉTODOS 28
3.1 Camundongos, *T. cruzi* e infecção 28
3.1.1 Repique in vivo de parasitas da cepa Y e obtenção de tripomastigotas livres de anticorpos 28
3.2 Obtenção dos anticorpos específicos 29
3.3 Parasitemia direta e semi-quantitativa 29
3.4 Avaliação da presença de parasitas vivos em diferentes órgãos 30
3.5 Expressão gênica específica por meio de qRT-PCR 30
3.6 Depleção dos macrófagos 31
3.7 Cultura celular de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e do peritônio 31
3.7.1 Infecção de macrófagos in vitro 32
3.8 Quantificação de NO pela Reação de Griess 32
3.9 Análise estatística 33
4 RESULTADOS 34
4.1 Obtenção de soros imunes 34
4.2 Avaliação *in vivo* da participação dos anticorpos específicos (IgM e IgG) na remoção de parasitas Sylvio X10/4 da corrente sanguínea 34
4.3 Avaliação *in vivo* da participação de células da linhagem macrofágica na remoção espontânea de parasitas Sylvio X10/4 da corrente sanguínea 36
4.4 Análise da parasitemia subpatente de animais tratados no dia 4 p.i. com soros crônicos de camundongos WT ou CD28KO 39

4.5 Análise da carga parasitaria no fígado, baço e pulmão de animais tratados no dia 4 p.i. com soros crônicos de camundongos WT ou CD28KO 45
4.6 Análise da remoção de tripomastigotas da cepa Y do sangue por soro imune de camundongo CD28KO (infectado por parasitas Sylvio X10/4) 48
4.7 Avaliação *in vitro* da interação de células da linhagem macrofágica e anticorpos específicos contra parasitas Sylvio X10/4 51
5 DISCUSSÃO 57
6 CONCLUSÕES 62
REFERÊNCIAS* 63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*, e foi descoberta em 1909 pelo brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) (RASSI JR; RASSI; MARCONDES, 2012). Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, (HOTEZ et al., 2009) a doença de Chagas tem sido um flagelo para a humanidade desde a antiguidade, e continua a ser um relevante problema social e econômico em muitos países da América Latina (MONCAYO; SILVEIRA, 2009; RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Mais ainda, países não endêmicos têm apresentado nas ultimas décadas casos de doença de Chagas devido à migração da população de áreas endêmicas, se tornando assim um problema global (MACHADO et al., 2012).

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida que alterna entre hospedeiros vertebrados (que compreendem um grande numero de mamíferos, incluindo humanos) e hospedeiros invertebrados (insetos que pertencem à família Reduviidae, subfamília Triatominae, tais como *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* (FERNANDES; ANDREWS, 2012; NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009) (que no Brasil são denominados de barbeiros. Além da transmissão vetorial, a contaminação pode ocorrer por transfusão sanguínea, transmissão congênita, acidentes de laboratório, transplante de órgãos e/ou medula óssea infectados, além da ingestão de alimentos e bebidas contaminadas com *T. cruzi*. No Brasil, em função ao controle da transmissão vetorial, assim como ao melhor controle nos bancos de sangue, houve nos últimos 30 anos uma diminuição drástica no número dos casos agudos, as poucas ocorrências resultando da ingestão de alimentos crus contaminados por barbeiros infectados (RASSI JR; RASSI; MARCONDES, 2012).

A doença de Chagas apresenta uma fase aguda, frequentemente assintomática, onde a ativação da resposta imune especifica determina o controle, porém não estéril, do parasita (NAGAJYOTHI et al., 2012). Alguns casos sintomáticos podem apresentar sinais do ponto de entrada (sinal de Romaña), febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite em casos severos. A fase crônica se apresenta usualmente como

uma forma indeterminada assintomática, com eletrocardiograma inalterado e radiografias normais de coração, esôfago e colón. Alguns casos podem apresentar a forma cardíaca ou digestiva (megaesôfago ou megacolón), ou, mais raramente, uma associação entre as duas formas. A forma cardíaca crônica é a manifestação clínica mais significativa da doença de Chagas, por sua frequência e gravidade. É geralmente detectada entre as segunda e quarta década de vida, 5-15 anos após a infecção inicial. Os sinais e sintomas de cardiomiopatia chagásica crônica são: arritmia, insuficiência cardíaca, bloqueios de ramo atrioventricular e tromboembolismo. (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

1.2 Ciclo e diversidade do *Trypanosoma cruzi*

Entre os tripanosomatídeos, o *T. cruzi* apresenta um dos ciclos de vida mais complexo, com vários estágios de desenvolvimento envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados. (ROMANO et al., 2012).

Inicialmente, tripomastigotas circulantes do sangue de um mamífero hospedeiro infectado são ingeridos pelo vetor durante sua alimentação. Estes tripomastigotas se transformam em epimastigotas e se multiplicam por divisão binária na porção média do intestino. Após isso, no intestino grosso do vetor, os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metaciclicos infectantes que são depositados nas fezes durante a próxima alimentação. A transmissão natural ocorre quando as fezes contaminam mucosas nasais, orais, conjuntivas, ou feridas na pele, incluindo aquela acontecida na picada do vetor (MACHADO et al., 2012).

A fase epimastigota, altamente replicativa, porém, sem grande potencial para a invasão celular, é enriquecida em enzimas metabólicas, enquanto a forma tripomastigosta, é recoberta com proteinas de superficie, que estão associadas a invasão de células do hospedeiro e evasão da resposta desenvolvida pelo sistema imune (LIMA et al., 2010).

Uma vez dentro do hospedeiro, o parasita pode invadir diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, fibroblastos e células de musculatura lisa e/ou estriada. Após a invasão, os tripomastigotas metaciclicos precisam sobreviver e escapar do ambiente altamente oxidativo encontrado dentro do fagossomo para estabelecer a infecção. Desta forma, os parasitas escapam do fagolisossoma para o citoplasma, diferenciando-se em amastigotas, a forma replicativa do hospedeiro

vertebrado. Após diversos ciclos de divisão binária, os amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneos, que são liberados na ruptura das células. Estas formas infectantes acessam a corrente sanguínea e continuam a invadir outras células nucleadas, podendo ser ingeridas pelo vetor, reiniciando o ciclo (OSORIO et al., 2012).

O *T. cruzi* representa uma espécie geneticamente diversa, compreendendo várias cepas que circulam em diversos hospedeiros. Baseado na análise de proteínas e marcadores genéticos, seis grupos de *T. cruzi* foram descritos TcI-TcIV, sendo as mais estudados o *T. cruzi I* (predominante no ciclo de transmissão silvestre em áreas endêmicas) e o *T. cruzi II* (encontrado no ambiente doméstico em países da América do sul) (ZINGALES et al., 2009).

A heterogeneidade do parasita tem sido extensivamente estudada através de métodos biológicos, bioquímicos e moleculares, que explicam parcialmente as manifestações clínicas variadas da doença de Chagas e as diferenças geográficas na morbidade e mortalidade (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Sylvio X10/4, parasita escolhido para os estudos neste trabalho, é um clone de baixa virulência pertencente ao primeiro grupo filogenético TcI de *T. cruzi*. Este clone é conhecido por seu miotropismo e promove uma infecção sem parasitemia patente em camundongos normais. Mais importante, na linhagem de camundongos C3H/HePAS, determina um quadro de miocardite crônica que apresenta grandes similaridades com o quadro de miocardiopatia chagásica crônica em humanos (MARINHO et al., 2009). Além desta última característica, a utilização de um parasita de baixa virulência como Sylvio x10/4 permite obter informações sobre a resposta imune desenvolvida durante a infecção que passariam despercebidas com parasitas de alta virulência.

1.3 Resposta imune ao *T. cruzi*

A resposta inata frente a patógenos intracelulares como o *T. cruzi*, envolve: (1) detecção dos parasitas pelos TLRs e NLRs (PRRs; receptores de reconhecimento de padrão molecular) nas células do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, e eventualmente sua destruição pelos macrófagos ativados, e (2) apresentação de antígeno pelas células dendríticas para ativação da resposta imune adquirida (TARLETON, 2007).

Células da imunidade inata possuem uma importante participação no controle da replicação e propagação do parasita durante ambas as fases aguda e crônica da infecção, (JUNQUEIRA et al., 2010) produzindo mediadores pró-inflamatórios como a interleucina-12 (IL-12), o fator de necrose tumoral (TNF-α) e mediadores efetores como proteases, radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO). Por outro lado, nas respostas imunes a patógenos intracelulares, IL-12 é um mediador chave na ativação de células natural killer (NK) e sua consequente produção de IFN-γ, citocina que possui papel crucial na ativação dos macrófagos, estimulando a produção de óxido nítrico, elemento tóxico para microoganismos intracelulares (KAYAMA; TAKEDA, 2010).

Ao mesmo tempo, as células dendriticas fazem a ligação entre a imunidade inata e adquirida. A produção de IL-12 leva a diferenciação de linfócitos T helper $CD4^+$ (Th1), e contribui indiretamente à ativação dos linfócitos T $CD8^+$ e células B. Além da destruição direta de células infectadas pelos linfócitos T $CD8^+$, a produção de IFN-γ por células T $CD4^+$Th1 e células T $CD8^+$ determina, como indicado acima, uma maior ativação dos macrófagos para destruição dos parasitas fagocitados. Por outro lado, os anticorpos IgG produzidos pelas células B *T. cruzi*-específicas, e principalmente aqueles das subclasses ativadoras de complemento / opsonizadoras, participam da eliminação dos tripomastigotas extracelulares ao promover a lise e/ou fagocitose destes (JUNQUEIRA et al., 2010).

1.3.1 Escape do T. cruzi ao sistema do complemento

A habilidade dos parasitas de sobreviver e multiplicar-se em seus hospedeiros depende da sua capacidade em inibir ou evitar a resposta imune. Um dos primeiros obstáculos encontrado pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado é o sistema complemento, conjunto de elementos que desempenha um papel importante na contenção e remoção de muitos microrganismos mesmo antes do desenvolvimento da imunidade adquirida (OSORIO et al., 2012). No caso do *T. cruzi* foi muito bem estabelecido que, enquanto epimastigotas são rapidamente mortos pela via alternativa do complemento, as formas tripomastigotas são resistentes aos efeitos líticos desta (KIPNIS et al.,1981).

A resistência de tripomastigotas ao complemento depende da presença na sua superficie de glicoproteinas regulatórias, que restringem a ativação do sistema. A resistência à lise mediada por complemento (CML) é devida à expressão de um glicoproteína de superfície de 87-93 kDa, denominada fator de aceleração de decaimento do *T. cruzi* (T-DAF), que interfere na montagem eficiente das C3 convertases de ambas as vias (clássica e alternativa) (TAMBOURGI et al., 1993). Proteínas reguladoras do complemento (CRP's) são glicoproteinas ancoradas que inibem a ativação da via clássica e alternativa do complemento, sendo expressas em tripomastigotas, porém, não por epimastigotas (NORRIS; BRADT; SO, 1991).

O *T. cruzi* também é capaz de ativar a via das lectinas, caracterizada por uma rápida ligação de lectina a H-ficolin, e L-ficolin, presentes na superfície do parasita foi demonstrada. No entanto, tripomastigotas que expressam uma proteína de superfície inibitória do receptor C2 do complemento (CRIT) são capazes de inibir a ativação da via das lectinas e morte causada pelo sistema complemento (CESTARI et al., 2009).

TcCRT (Calreticulina) é uma outra molécula na superfície do *T. cruzi* que interage com a molécula C1q, inibindo a ativação da via clássica do complemento. Por outro lado, o *T. cruzi* utiliza a TcCRT para capturar a molécula C1, o que confere maior infectividade ao parasita (VALCK et al., 2010).

1.3.2 Atuação dos macrófagos

O sistema mononuclear fagocítico é gerado a partir de células-tronco hematopoiéticas comprometidas localizadas na medula óssea. Os precursores de macrófagos são liberados na circulação como monócitos, distribuindo-se pelos tecidos de todo o corpo. Quando os monócitos migram da circulação para o tecido, se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Os macrófagos são divididos em subpopulações baseadas em sua localização anatômica e funcionalidade. Macrófagos especializados residentes em tecidos incluem: osteoclastos (tecido ósseo), macrófagos alveolares (pulmão), histiócitos (tecido conjuntivo) e células de Kupffer (fígado). Uma população distinta patrulha os sítios imunologicamente privilegiados, como o cérebro (células da microglia), olhos e testículos (MURRAY; WYNN, 2011).

Os macrófagos ingerem e processam materiais estranhos, assim como células mortas e detritos, além de recrutar diversas células em resposta a sinais inflamatórios. São células altamente heterogêneas que podem mudar rapidamente a sua função, em resposta a sinais do local em que se encontram (MURRAY; WYNN, 2011).

A responsabilidade de um fagócito mononuclear frente a um alvo pode ser multifacetada. Por exemplo, para a remoção efetiva de microorganismos patogênicos, devem primeiro detectar estes usando receptores de superfície, e então englobá-los e eventualmente destruí-los. Somado a isso, estas células produzem citocinas pró-inflamatórias que orquestram a inflamação local e sistêmica. Alguns fagócitos processam antígenos e os apresentam às células T, direcionando o desenvolvimento da imunidade adaptativa (UNDERHILL; GOODRIDGE, 2012).

Monócitos/macrófagos desempenham papel importante na fase aguda e crônica da doença de Chagas. Ratos infectados com parasitas da cepa Y de *T. cruzi* apresentam um aumento dos monócitos no sangue periférico até o 12º dia de infecção e a depleção de macrófagos pelo tratamento com sílica causa aumento significativo no número de ninhos de amastigotas. (MELO; MACHADO, 2001).

Em reposta ao parasita, os macrófagos ativados passam a expressar iNOS e a produzir óxido nítrico em altas quantidades que irá auxiliar no controle da proliferação do parasita já desde a fase aguda da doença. O mecanismo de ação pelo qual o NO realiza seu efeito citotóxico contra o *T. cruzi* não está completamente esclarecido, mas indica-se que o NO seja capaz de interferir diretamente no metabolismo do parasita, como por exemplo, inibindo a atividade da enzima cruzipaína que tem um importante papel na nutrição e invasão celular pelo *T. cruzi* (VENTURINI et al., 2000).

Animais C57BL/6 iNOS$^{-/-}$ infectados com parasitas das cepas Colombiana ou Y desenvolvem um maior número de ninhos no tecido cardíaco quando comparado aos camundongos normais, indicando a importância do óxido nítrico no controle da infecção por *T. cruzi* (BORGES et al., 2009).

Como citado acima, o reconhecimento do parasita ocorre na interação de PRR's (receptores padrões de reconhecimento) dos macrófagos com os PAMP's (padrões moleculares associados a patógenos) do *T. cruzi*. Dentre os PRR's estudados, estão os receptores TLR2 e TLR9 (GRAVINA et al., 2013), o Nod1 (SILVA et al., 2010) e o inflamossomo NLRp3 (GONÇALVES et al., 2013) tem

participação importante no reconhecimento deste parasita. Os receptores do tipo Toll (TLR's) (com a excepção de TLR3) induzem a produção de citocinas dependente da indução do fator nuclear de transcrição (NF-kB), envolvendo a molécula adaptadora de fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) (TRINCHIERI; SHER, 2007). O TLR2 reconhece âncoras GPI (glico-inositol-fosfolipidio), glicoproteinas distribuidas por toda a superficie de membrana do parasita, mas a proteína Tc52 do *T. cruzi* também foi identificada como potente indutor de TLR2. TLR9 é ativado através do reconhecimento de oligodesoxinucleotideos não metilados (CpG) encontrados de forma abundante no genoma do *T. cruzi* (KAYAMA; TAKEDA, 2010). Ambos TLRs podem ser ativados ao mesmo tempo em resposta ao *T. cruzi*. Células dendriticas de camundongos duplo-nocautes para TLR2 e TLR9 produzem níveis mais baixos de IL-12p40 do que células de camundongos deficientes somente em TLR9. Por outro lado, camundongos deficientes em ambos receptores apresentam maior suscetibilidade a infecção e aumento de carga parasitária quando comparados a camundongos selvagens ou deficientes exclusivamente de TLR2 ou TLR9 (BAFICA et al., 2006).

Tais reconhecimentos levam a fagocitose, que envolve a invaginação da membrana plasmática seguida da fusão intracelular do fagossomo e lisossomo, estrutura que possui conteúdo enzimático e constitui um fator importante na prevenção da progressão do ciclo intracelular do parasita (VIEIRA et al., 2002) (SMITH; MAY, 2013). Em alguns casos, parasitas com alta mobilidade podem invadir as células do hospedeiro diretamente, independente da polimerização de actina. Esse processo, entretanto, também envolve o recrutamento e a fusão dos lisossomos para o local de entrada do parasita, retendo os mesmos, dentro dos macrófagos (GUTIERREZ et al., 2007).

1.3.3 Papel dos anticorpos específicos na fagocitose de T. cruzi

A fagocitose pode ser facilitada pela opsonização, um processo pelo qual os componentes da imunidade humoral (presentes no soro) induzem a internalização. Tais componentes são conhecidos como opsoninas, que incluem imunoglobulinas, colectinas e partículas do sistema complemento (CAMPAGNE; WIESMANN; BROWN, 2007).

Estudos com soro imune de animais infectados com *T. cruzi* da cepa Y (altamente virulenta e reticulotrópica) demonstraram a grande participação dos anticorpos na remoção de tripomastigotas da circulação: após 5 minutos da inoculação de 200 μl de soro imune não diluído, todos os parasitas haviam sido removidos da circulação (UMEKITA; TAKEHARA; MOTA, 1988). Outros trabalhos permitem conclusão similar: assim, a infecção murina com tripomastigotas da cepa Y tratados com soro imune determina uma menor parasitemia do que aquela no grupo controle infectado com parasitas não tratados (KRETTLI; BRENER, 1976). Tais resultados demonstram uma forte capacidade dos anticorpos da classe IgG em induzir a remoção dos parasitas e conferir proteção ao hospedeiro (UMEKITA; RAMOS; MOTA, 1997). A presença de anticorpos de alta afinidade resulta em um equilíbrio entre parasitas e o organismo infectado que contribui a uma maior sobrevivência do hospedeiro (UMEKITA et al., 1999; UMEKITA; MOTA, 2000).

Macrófagos associados a anticorpos IgG2a foram demonstrados como essenciais na remoção de *T. cruzi* no sangue e nos tecidos. Através da porção $F(ab')_2$, os anticorpos específicos se ligam a antígenos de microorganismos enquanto sua porção constante Fc se liga aos receptores Fc (FcRs) na superfície dos fagócitos, facilitando assim a internalização destes agentes infecciossos (ADEREM; UNDERHILL, 1999; JOSHI; BUTCHAR; TRIDANDAPANI, 2006). Por outro lado, os FcRs contêm motivos de ativação (ITAMs) em sua cauda citoplasmática ou em subunidades associadas (SWANSON; HOPPE, 2001). Sinais estimulatórios são promovidos através destes ITAMs que propiciam a ativação de quinases (Lyn, Hck, Syk, p85, PI-3K) através de cascatas de fosforilação que induzem a uma extensa variadade de respostas, tais como, grande produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de citocinas, fagocitose e morte celular induzida por citoxicidade (JOLLER; WEBER; OXENIUS, 2011).

Distintas classes de receptores para a IgG (FcγR's) existem em monócitos, macrófagos e neutrófilos humanos: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa e FcγRIV (JOLLER; WEBER; OXENIUS, 2011; ZAUNER et al., 2013). Fagócitos murinos, entretanto, não expressam FcγRIIIa (JOSHI; BUTCHAR; TRIDANDAPANI, 2006).

Por outro lado, os receptores para IgM são os Fcα/μR, presentes na maioria dos linfócitos B e macrófagos, porém ausentes em células T, granulócitos e NK (SHIBUYA et al., 2000). Pela sua estrutura pentamérica a IgM é a classe de

imunoglobulina dotada de maior capacidade aglutinante de antígenos, excedendo à da IgG por volta de 100-10.000 vezes (KLIMOVICH, 2011). Contudo, a ativação da via clássica do complemento é tida como a principal e mais estudada função efetora da IgM. O processo de ativação é iniciado pela ligação da molécula C1q, o primeiro componente da via clássica a IgM, desencadeando uma cascata de serina proteases que cliva C3 em sua forma ativa, C3b. Através da ativação do complemento a IgM propicia indiretamente uma ponte entre os microorganismos e os fagócitos, uma vez que estes últimos possuem receptores (CRs) para fragmentos de C5, assim como para os fragmentos de C3, C3b e C3bi, que propiciam a internalização de microorganismos (CAMPAGNE; WIESMANN; BROWN, 2007). No entanto, pouco sabemos do resultado desta interação sobre a ativação do fagócito e qual sua importância no controle do parasita. O papel da IgM na proteção contra o *T. cruzi* foi pouco estudado devido a dois motivos: a rápida mudança de classe para anticorpos IgG de alta afinidade no decorrer da resposta imune e o fato da maioria da IgM circulante se tratar de anticorpos naturais não específicos frente ao parasita.

Na infecção murina pelo *T. cruzi* a resposta humoral específica é poliisotípica com predomínio dos anticorpos IgG2a e IgM (EL BOUHDIDI et al., 1994). Estes anticorpos aparecem a partir da segunda-terceira semana de infecção e participam da eliminação dos parasitas circulantes (KIPNIS et al., 1981). Como citado acima, o papel de anticorpos específicos da classe IgG na remoção de parasitas e sua contribuição à proteção durante a infecção com *T. cruzi* está claramente demonstrada. Porém, estudos são necessários para demonstrar a participação da IgM na protecão e no processo de internalização dos parasitas por células da linhagem macrofágica. Camundongos CD28-KO infectados com parasitas *T. cruzi* Sylvio X10/4 apresentam uma resposta humoral limitada a produção de imunoglobulinas especificas da classe IgM (em niveis similares aos camundongos selvagens), com nenhuma ocorrência de anticorpos IgG1 e IgG2a (MARINHO et al., 2007). Possibilitando, a obtenção das IgM especificas, alvo de estudo deste projeto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo pretende avaliar o papel dos soros imunes contendo anticorpos específicos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgG, ou somente IgM, na interação *in vivo* e *in vitro* de parasitas Sylvio X10/4 e células da linhagem macrofágica.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o papel dos soros imunes de camundongos B6 e CD28KO infectados pelo *T. cruzi* (que contém respectivamente anticorpos específicos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgG, ou exclusivamente IgM) na remoção de tripomastigotas Sylvio X10/4 da corrente sanguínea, e determinar os órgãos de destino do parasita após sua saída espontânea ou induzida pelo anticorpo, assim como as consequências destas formas de remoção na resposta imune desenvolvida;

- Avaliar o papel dos soros imunes de camundongos B6 e CD28KO na internalização *in vitro* de parasitas por células da linhagem macrofágica, assim como na subsequente ativação destas células;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos, *T. cruzi* e infecção

Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 (WT, do inglês *Wild-type*) e camundongos imunodeficientes CD28KO (em *background* C57Bl/6), com 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação. Todos os procedimentos que envolvem animais estão de acordo com as diretrizes aprovadas pela Comissão Brasileira de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo n. 140).

Os animais foram inoculados via intravenosa (i.v.), ou via intraperitoneal (i.p.), com tripomastigotas do clone Sylvio X10/4 oriundos de cultura *in vitro* em células LLCMK2 mantidas em meio RPMI suplementado com 3% SFB (soro fetal bovino). Utilizou-se a infecção de camundongos C57BL/6 pela via intravenosa (retrorbital) para que os parasitas atinjam a corrente sanguínea de forma imediata, e sua saída ou remoção possa ser estudada. A via intraperitoneal foi utilizada na infecção de animais C57BL/6 e CD28KO para obtenção de soros crônicos.

3.1.1 Repique in vivo de parasitas da cepa Y e obtenção de tripomastigotas livres de anticorpos

Algumas das experiências de remoção in vivo do *T. cruzi* foram realizados com parasitas da cepa Y, mantidos através de repiques semanais em camundongos A/J. A partir deste repique, foram infectados animais A/J com $2{,}5 \times 10^4$ parasitas via i.p. e após 48 horas de infecção, os animais foram tratados via i.p. com ciclofosfamida (200 mg/kg de peso), para impedir a ativação da resposta imune específica e a produção de anticorpos. No sétimo dia de infecção, os animais foram sangrados por punção cardíaca, e o sangue diluído em PBS 10% SFB e centrifugado por 10 minutos, a 1200 rpm, 4 ºC, possibilitando separar a maior parte dos tripomastigotas (que se encontram no sobrenadante) das hemácias (que permanecem no pellet). O sobrenadante foi centrifugado por 20 minutos, a 3000 rpm

(UMEKITA; RAMOS; MOTA, 1997) e a seguir, os tripomastigotas que se encontram no pellet, foram ressuspendidos em 1 mL de PBS e contados em câmara de Newbauer. Após a contagem, os parasitas foram ajustados para $2x10^6$/200 μL, para infecção por via intravenosa (retroorbital) e estudo do “clearance” (remoção) *in vivo*.

3.2 Obtenção dos anticorpos específicos

Animais C57BL/6 e C57BL/6 CD28KO foram inoculados intraperitonealmente com $2x10^5$ parasitas Sylvio X10/4 e mantidos, sem qualquer outra manipulação, até a fase crônica avançada (200 a 250 dias de infecção), quando foram sangrados através de punção cardíaca. O sangue foi conservado overnight a 4 ºC, e, após centrifugação, o soro de cada camundongo foi retirado e aliquotado individualmente. Posteriormente, foi realizada avaliação por ELISA para estimar a presença de anticorpos específicos ao parasita das classes IgM e IgG.

Após confirmarmos individualmente o perfil de anticorpos anti-*T. cruzi* dos animais C57BL/6 e CD28KO foram realizados os seguintes “pools” de soros destinados aos experimentos *in vivo* e *in vitro*: soro de camundongos C57BL/6 controles (que carece de anticorpos específicos anti-parasita); soro de camundongos C57BL/6 crônicos (B6-IMS, contendo IgM e IgG específicos anti-parasita); e soro de camundongos C57BL/6 CD28KO crônicos (CD28KO-IMS, contendo somente IgM especifica anti-parasita). Em experiências anteriores do laboratório foi mostrado que na ausência da molécula co-estimulatória CD28, não ocorre “switch” de classe de imunoglobulinas, em tal forma que a totalidade dos anticorpos anti-*T. cruzi* é da classe IgM (MARINHO et al., 2007).

3.3 Parasitemia direta e semi-quantitativa

O número de parasitas no sangue circulante foi determinado, nos tempos de 10, 30, 60, 120 minutos e 24 horas após a infecção, de acordo com o método descrito por Melo e Brener (1978). Assim, 5 µl de sangue da cauda dos animais infectados foram colhidos, colocados sobre uma lâmina e coberta por uma lamínula para obter uma camada que ocupe homogeneamente toda a superfície da lamínula. Esta lâmina foi levada ao microscópio óptico (400X) e o número de formas tripomastigotas determinados em 50 campos. Desta forma, conhecendo-se a área

de cada campo microscópico, foi possível determinar a quantidade de parasitas por mL.

Além deste procedimento, também foi feita a análise semi-quantitativa da parasitemia subpatente através de cultura em meio LIT (do inglês, *Liver Infusion Tryptose*) de alíquotas de 0,2 µl, 1 µl e 5 µl de sangue, em quintuplicatas. As culturas foram mantidas a 28 °C e a cada 7 dias observadas no microscópio de fase para verificar a presença de parasitas, num período total de 21 dias, somando 3 leituras. Foi determinado um “score” para avaliar o grau de positividade das culturas: poços com até 10 parasitas recebem atribuição de 1 ponto, culturas que apresentam de 10 a 100 parasitas, 2 pontos, e poços com mais de 100 parasitas, 3 pontos. A soma dos pontos dos 5 poços (quintuplicata) de cada animal é apresentada como “score”.

3.4 Avaliação da presença de parasitas vivos em diferentes órgãos

A avaliação da presença de parasitas vivos foi realizada por cultura em meio LIT, com alíquotas contendo 0,1 e 0,5 mg de tecido homogeneizado dos órgãos pulmão, fígado e baço, em quintuplicatas. Para evitar a contaminação dos órgãos com sangue periférico, os animais foram perfundidos com tampão fosfato salino (PBS), injetado no ventrículo direito por uma bomba peristáltica Pump Pro TPM (Watson-Marlow Inc., Wilmington, Massachusetts, USA) com a veia cava inferior seccionada. O nível de carga parasitária (estimada através das culturas em meio LIT) foi expresso pelo número de culturas que positivaram e o número de animais com culturas positivas.

3.5 Expressão gênica específica por meio de qRT-PCR

A presença do parasita foi também avaliada por ensaio de qRT-PCR. Alíquotas do baço, fígado e pulmão de camundongos previamente perfundidos foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas e armazenadas em Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, USA) a -80 ºC até a data de processamento. O RNA total foi obtido utilizando o Kit RNeasy® Mini (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) seguindo o protocolo do fabricante para tecidos animais. Um micrograma de RNA total foi convertido em cDNA (High Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, California, USA) de acordo com as especificações do fabricante. A expressão foi quantificada por qRT-PCR utilizando-se o ensaio Platinum® SYBR® Green (Invitrogen Life Technologies) e 4pmol/µl de “primers” específicos para o gene 18S rRNA (AF303659) - Tc18S-F 5’- TTGAATTGAGGGCCTCTAAGG-3’ e Tc18S-R 5’- AAAGGTACCACTCCCGTGTTT-3’ (SARDINHA et al., 2010). A quantificação do cDNA específico do parasita foi realizada usando o equipamento e *software* ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e levaram em consideração os valores de uma curva padrão com concentração entre $2{,}5x10^1$ a $2{,}5x10^7$ cópias de cDNA de *T. cruzi*.

3.6 Depleção dos macrófagos

Os macrófagos foram depletados através da administração de lipossomas encapsulando clodronato bisfosfonato. Os lipossomas injetados via intravenosa são fagocitados por macrófagos e células dendríticas. No interior destas células são subsequentemente expostos a fosfolipases lisossomais intracelulares que conduzem à degradação das bicamadas fosfolipídicas com liberação de moléculas de clodronato dentro das células, em tal forma que a certa concentração intracelular de clodronato a célula será eliminada por apoptose. O clodronato liberado pelos macrófagos deixa a circulação rapidamente (VAN ROOIJEN; VAN KESTEREN-HENDRIKX, 2002).

3.7 Cultura celular de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e do peritônio

As células da linhagem macrofágica utilizadas foram derivadas de precursores encontrados na medula óssea (BMDM, “bone-marrow-derived-macrophages”) de camundongos C57BL/6. Após a extração da medula dos fêmures dos camundongos, as células foram mantidas em cultura com meio DMEM-F12 contendo soro fetal bovino (10%), piruvato (1%), glutamina (1%) e gentamicina (0,05%). No segundo dia de cultura, o sobrenadante da garrafa contendo os precursores foi retirado e centrifugado, e as células no “pellet” ressuspensas em meio contendo os componentes já citados, acrescido de sobrenadante de células

L929 (20%), produtoras do fator de crescimento M-CSF, necessário para diferenciação de macrófagos. Após 3 dias de cultura neste meio, as células receberam mais meio com sobrenadante, sendo que no sétimo dia de cultura as células estão totalmente diferenciadas e prontas para o uso. As células foram removidas com tripsina 0,04% (Gibco) e replaqueadas em Chamber's slides (Lab-Tek Brand Products).

Obtenção dos macrófagos peritoneais: camundongos C57BL/6 foram inoculados com 1% de amido em PBS 1X pela via intraperitoneal e no quarto dia as células retiradas através da lavagem do peritônio com 5 mL de PBS 1X gelado (facilita a liberação das células). Após isso, as células foram centrifugadas, contadas e plaqueadas. Após 4 horas de aderência ao plástico, as placas são lavadas para retirada das células não aderidas e mantidas em cultura com meio DMEM-F12 3% SFB.

3.7.1 Infecção de macrófagos in vitro

Para estas experiências utilizamos tripomastigotas do clone Sylvio X10/4, oriundos de cultura em células LLCMK2 mantidas *in vitro* em meio RPMI suplementado com 3% SFB (soro fetal bovino). Os sobrenadantes das culturas são coletados e centrifugados por 5 minutos, a 4º C, a 1200 rpm, para que as células e debris permaneçam no pellet. A seguir, o tubo é mantido em estufa durante 15 minutos, para que os tripomastigotas no pellet possam nadar para o sobrenadante, que é coletado para um novo tubo que é centrifugado, a 3000 rpm. O pellet é ressuspendido em DMEM-F12 3% e os parasitas contados em câmaras de Newbauer. Os parasitas são reajustados a um volume de 100 μl e adicionados às culturas de macrófagos, que já contém 100 μl de meio e 5 μl dos diferentes "pools" de soros (diluição final dos soros 1/40, para evitar aglutinação dos parasitas). Após 5 horas de infecção, a primeira lâmina é retirada, assim como às 24, 48 e 72 horas.

3.8 Quantificação de NO pela Reação de Griess

Os sobrenadantes das culturas infectadas foram coletados em 5, 24, 48 e 72 horas após a infecção. A quantificação de NO foi feita pela reação de Griess. O

volume de 50 μl do sobrenadante foi misturado com 50 μl de reagente de Griess [diluição final vol/vol contendo: solução A (2,5 ml de ácido fosfórico, 0,5 g de sulfanilamida, 47,5 ml de H_2O milliQ) e solução B (0,05 g de N-1-naphitiletilenodiamida, 50 ml de H_2O milliQ)] em uma placa de 96 poços e incubado por 10-20 minutos a temperatura ambiente no escuro. A leitura foi feita em leitor de microplacas, no comprimento de onda de 540/570 nm. A curva padrão foi feita utilizando diluições de $NaNO_3$ (100 μM a 1,56 μM).

3.9 Análise estatística

Para as análises comparativas entre os grupos experimentais adotamos o teste Two-way ANOVA, seguido do Teste de Bonferroni, e o teste Log-rank (Mantel-Cox), utilizando o programa Prisma 5 (Graph Pad Software, La Jolla, California, USA), aplicados de acordo com cada situação como descrito nas legendas das figuras. Para saber se os grupos são significativamente diferentes ou se os resultados obtidos são frutos de mera flutuação randômica ou acaso, as diferenças entre as amostras foram expressas com média ± desvio padrão da amostra (média ± SD). Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de soros imunes

Para a realização da grande maioria dos experimentos do projeto, se fez necessária a obtenção de soros contendo os anticorpos específicos ao *T. cruzi*. Animais C57BL/6 e CD28KO (em fundo C57BL/6) foram infectados com $2x10^5$ parasitas Sylvio X10/4 via intraperitoneal e mantidos até a fase crônica da doença, pareados com os respectivos grupos controle. Os animais foram sacrificados por volta de 200 dias de infecção, e o sangue foi isolado através de punção cardíaca. Os soros foram testados individualmente por ELISA e após isso, realizamos um pool de cada grupo, que foram armazenados em freezer -80 ºC.

Conforme demonstrativo representado **(Fig. 1),** a análise por ELISA frente a antígeno de *T. cruzi* mostrou que o soro de camundongo CD28KO crônico contém altos níveis de IgM específica na ausência de IgG específica. Assim, o uso dos soros dos animais C57BL/6 e CD28KO cronicamente infectados ou controle permite criar três situações diferentes, onde temos a possibilidade de um tratamento com o conjunto IgM e IgG específicas (soro WT crônico), somente IgM especificas (soro CD28KO crônico) e na ausência de anticorpos específicos (soro WT controle).

4.2 Avaliação *in vivo* da participação dos anticorpos específicos (IgM e IgG) na remoção de parasitas Sylvio X10/4 da corrente sanguínea

Para avaliar a participação dos anticorpos na remoção de parasitas Sylvio X10/4 da corrente sanguínea, animais C57BL/6 foram tratados por via intravenosa com soros de camundongos WT não infectados, ou de camundongos WT e CD28KO cronicamente infectados e, após 15 minutos, infectados também por via intravenosa com parasitas Sylvio X10/4 obtidos de cultura de células LLCMK2 infectadas. Após 18 horas, os animais foram perfundidos, visando eliminar os parasitas circulantes no sangue e avaliar somente os parasitas intracelulares. Estes experimentos compreendem diversos estudos no fígado, baço e pulmão, tais como análise histopatológica, cultura em meio LIT de sangue e órgãos (para avaliar a presença de parasitas viáveis) e análise semi-quantitativa por PCR em tempo real da presença do *T. cruzi* e citocinas induzidas.

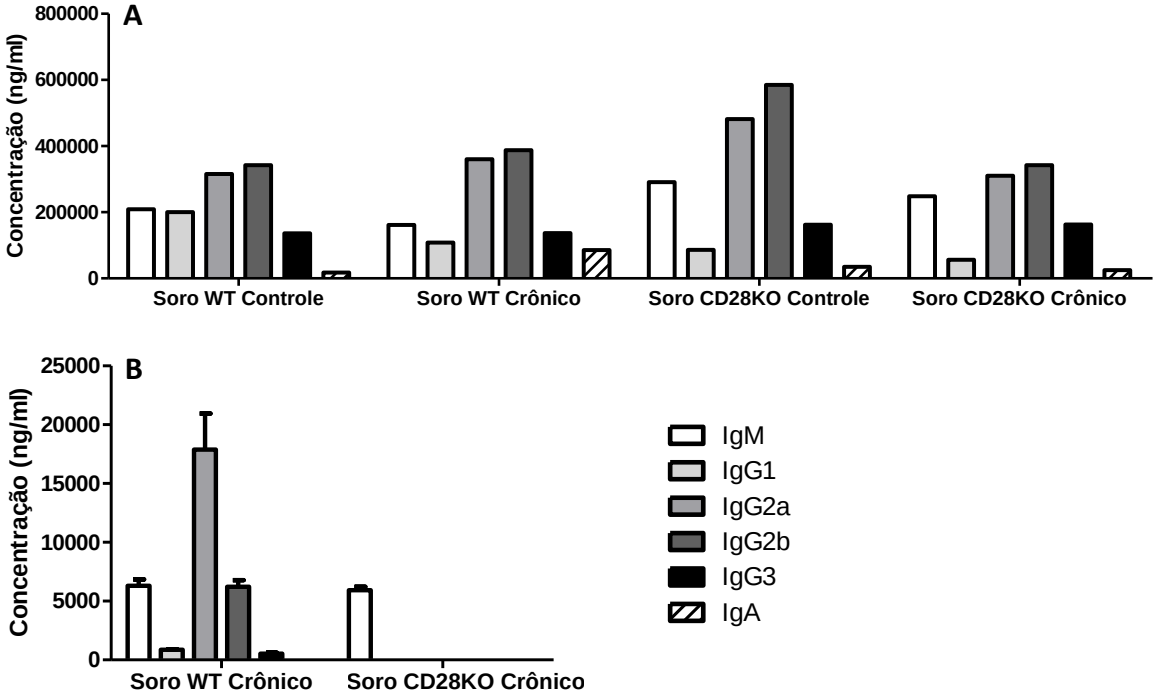

Figura 1. Quantificação de anticorpos no soro de camundongos WT e CD28KO selvagens ou cronicamente infectados pela técnica de ELISA. **(A)** Anticorpos totais (anti-imunoglobulina) **(B)** Anticorpos específicos frente a antígeno solúvel de *T. cruzi*, clone Sylvio X10/4.

Foram realizados dois experimentos deste tipo com o objetivo de estimar os órgãos alvo onde poderia ser encontrado o parasita após a sua saída, verificando se os anticorpos IgM ou IgM/IgG potencializariam a remoção dos parasitas da circulação e direcionariam seletivamente a saída para um determinado órgão, alterando no perfil inflamatório deste. No primeiro experimento, os camundongos foram inoculados iv com 5 milhões de parasitas, e, no segundo, com 2 milhões. Essa alteração se refere a tentativa de reduzir a infecção e evidenciar possíveis diferenças mascaradas entre os distintos tratamentos durante o primeiro experimento.

Os experimentos não apresentaram resultados idênticos, necessitando maior padronização. No entanto, em comum a ambos os experimentos, pode-se afirmar que, independentemente do soro utilizado no tratamento, o fígado e baço mostraram se os locais com maior concentração de parasitas às 18 horas da inoculação iv destes (**Fig. 2)**. Assim, para a nossa surpresa, não foi possível observar mudanças significativas decorrentes da administração dos soros normal e crônicos no que se

refere à carga parasitária nos diferentes órgãos (**Fig. 2**), intensidade dos infiltrados hepático e pulmonar (no exame histopatológico), e transcrição de citocinas nos diferentes órgãos, às 18 horas da inoculação iv dos parasitas. Estes achados, somados a resultados anteriores do laboratório, nos fizeram suspeitar que, ao contrário do imaginado, na ausência de qualquer anticorpo os parasitas estariam sendo removidos da circulação para o fígado e baço, sem mudanças adicionais importantes quando na presença dos soros contendo os anticorpos específicos.

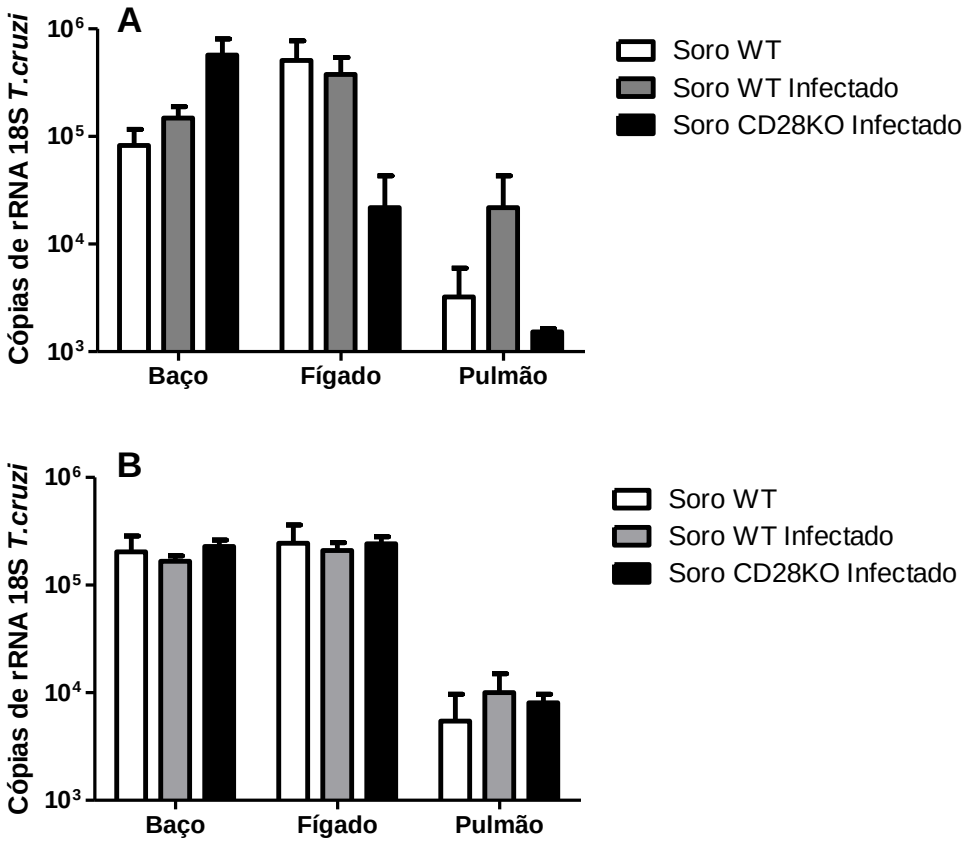

Figura 2. Carga parasitária no baço, fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 inoculados iv com diferentes soros e seguidamente com parasitas Sylvio X10/4. **(A)** Experimento 1 **(B)** Experimento 2. Os valores foram obtidos por PCR Real Time.

4.3 Avaliação *in vivo* da participação de células da linhagem macrofágica na remoção espontânea de parasitas Sylvio X10/4 da corrente sanguínea

Para verificar o envolvimento das células da linhagem macrofágica e células dendríticas na eventual remoção ativa do *T. cruzi* Sylvio X10/4 para o fígado e baço na ausência de anticorpos específicos, animais C57BL/6 foram tratados com

lipossoma de clodronato para eliminar estas células, e 4 dias mais tarde, inoculados iv com $5x10^5$ parasitas Sylvio X10/4, procedendo-se a avaliar a parasitemia patente e subpatente destes animais em relação às de animais infectados não tratados (grupo controle). Cabe ressaltar que na infecção endovenosa por parasitas Sylvio X10/4 poucos (raros) tripomastigotas são observados circulando no sangue nas duas primeiras horas após o inóculo. A partir deste tempo e no decorrer na infecção, as parasitemias passam a ser sub-patentes, ou seja, deixam de ser perceptíveis pelo exame direto do sangue, precisando de ensaios de amplificação para ser reveladas.

Em relação à parasitemia patente observou-se que nos camundongos tratados com clodronato, diferentemente aos animais controle, a presença de parasitas aumentava na corrente sanguínea às duas horas da infecção. Contudo, os valores se igualaram a zero após 24 horas de infecção **(Fig. 3).**

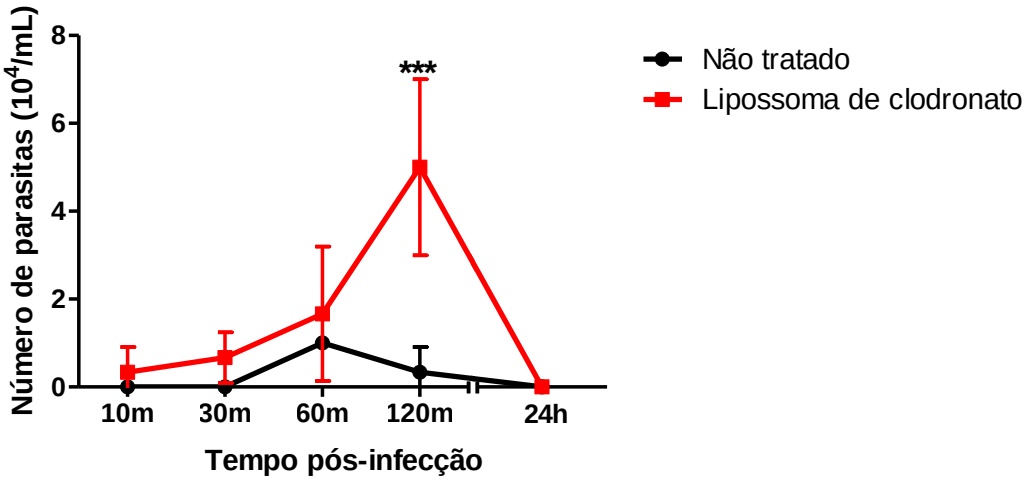

Figura 3. Parasitemia patente de animais não tratados e animais depletados de macrófagos e células dendríticas (tratados com lipossoma de clodronato). *** $p<0.001$

Já em relação aos níveis de parasitemia subpatente, estimados por cultura em meio LIT de alíquotas de sangue e leitura no microscópio invertido a cada 7 dias, observamos que 24 h após a inoculação dos parasitas, não houve positividade na 1ª leitura das culturas (aos sete dias de cultura) de animais controle, enquanto que cerca de 50% das culturas dos animais tratados com clodronato apresentaram positividade (**Fig.4 A**). No entanto, no 6º dia após inoculação dos parasitas, ocorreu um pico de parasitemia tanto no grupo tratado com clodronato como no grupo não tratado. Nos dias 8 e 12 após infecção, a parasitemia sofreu uma queda (mais

intensa no grupo não tratado) e no dia 15 no grupo tratado com clodronato observa-se um novo aumento da parasitemia, enquanto que no grupo não tratado a queda continua a progredir.

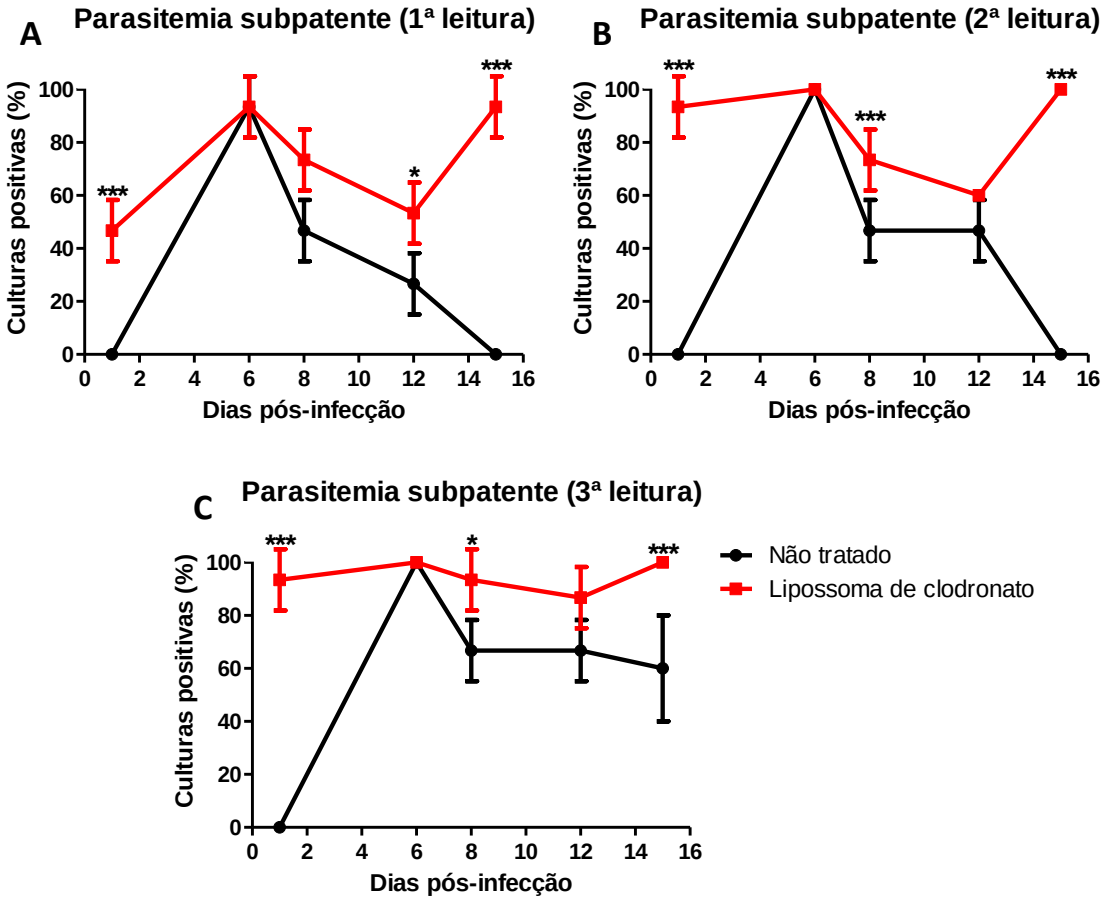

Figura 4. Parasitemia subpatente (5µl) de animais não tratados e tratados com lipossoma de clodronato. **(A)** 1ª leitura (7 dias de cultura em meio LIT). **(B)** 2ª leitura (14 dias de cultura em meio LIT). **(C)** 3º Leitura (21 dias de cultura em meio LIT). * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0.001.

Na segunda leitura, 14 dias de cultura, resultados semelhantes foram observados, com discretas alterações (**Fig.4 B**). Na terceira leitura é possível evidenciar de forma ainda mais clara a maior parasitemia do grupo tratado com clodronato no primeiro dia de infecção, enquanto que no 15º dia a diferença entre os grupos tratados e não tratado torna-se menos marcante. (**Fig.4 C**).

Além da porcentagem da positividade das culturas em meio L.I.T, também avaliamos os grupos por grau de positividade, definidos por um score das culturas positivas (previamente explicado). Na figura 5, podemos observar com mais detalhes, a maior presença de parasitas na circulação durante o primeiro dia pós-infecção nos animais tratados, tanto em relação à porcentagem de culturas positivas

assim como ao score. (**Fig. 5 A e C**) O mesmo pode ser observado no 15º dia de cultura, com a positividade no grupo controle somente demonstrada na 3ª leitura em meio L.I.T. (**Fig. 5 B e D**)

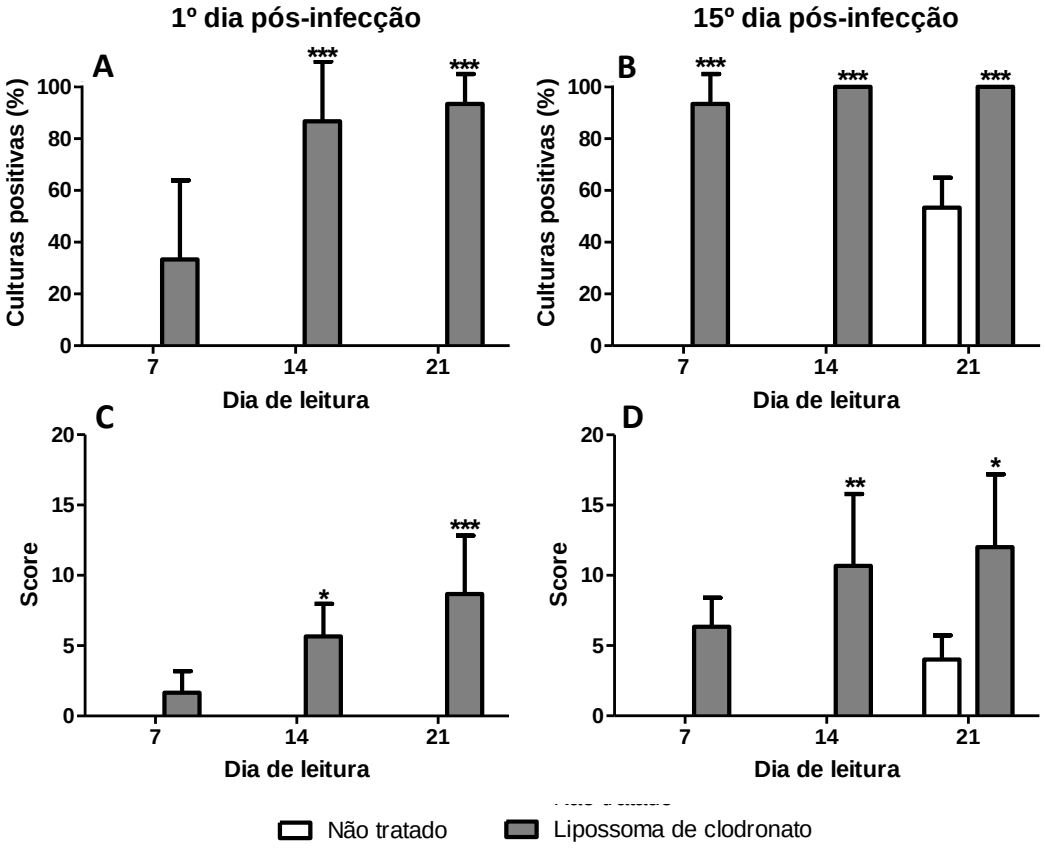

Figura 5. Parasitemia subpatente (5 μl) e Score de animais não tratados e animais tratados com lipossoma de clodronato. **(A)** Parasitemia subpatente no 1º dia pós-infecção. **(B)** Score das culturas positivas no 1º dia pós-infecção. **(C)** Parasitemia subpatente no 15º dia pós-infecção. **(D)** Score das culturas positivas no 15º dia pós-infecção. * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0.001.

Estes resultados indicam a participação dos macrófagos/células dendríticas na remoção da circulação dos parasitas recém-inoculados pela via endovenosa, resultado que dificulta o estudo dos efeitos opsonizadores dos soros contendo IgM ou IgM / IgG.

4.4 Análise da parasitemia subpatente de animais tratados no dia 4 p.i. com soros crônicos de camundongos WT ou CD28KO

Na busca de um melhor modelo experimental para verificar a ação *in vivo* dos soros contendo IgM/IgG ou IgG específicas, decidimos estudar como a parasitemia

se desenvolve nos primeiros dias pós-infecção. Para isso, animais C57BL/6 foram infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa, sendo observada sua parasitemia patente (10, 30, 60 minutos e 24 horas após a infecção) e subpatente durante o decorrer da infecção. **(Fig. 6A)**

Confirmando resultados anteriores do laboratório, não foi possível observar parasitemia patente após uma hora da inoculação iv de parasitas Sylvio X10/4. Com relação à parasitemia subpatente, estimada nas culturas com 5 μL de sangue, não observamos positividade no dia 3 de infecção, mas no 6º dia constatamos um pico que vai diminuindo gradativamente até o 50º dia (**Fig. 6B**). Analisando a parasitemia subpatente com menores volumes de sangue (1 μl), confirma-se que no 6º de infecção, ocorre a maior frequência de parasitas na corrente sanguínea, ocorrendo uma grande queda neste numero no 15º dia e se extinguindo nos dias seguintes analisados (**Fig. 6C**).

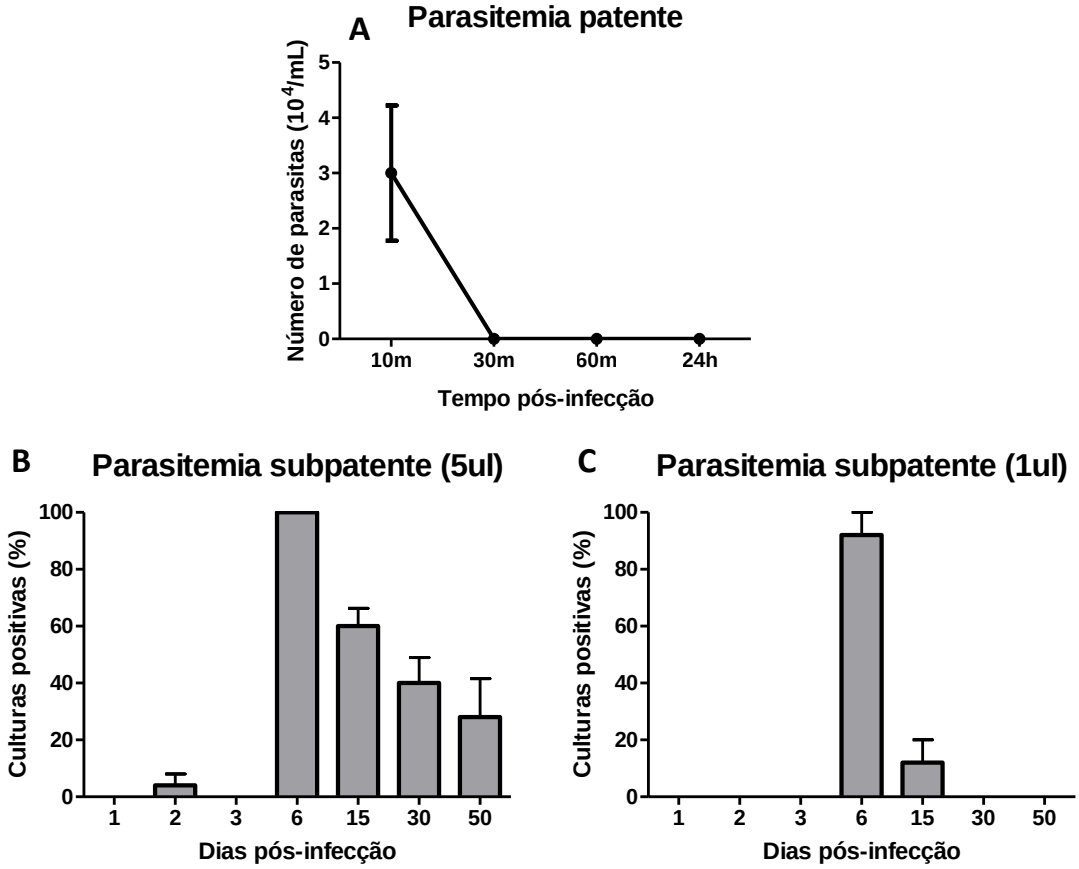

Figura 6. Parasitemia patente e subpatente de animais C57BL/6 infectados com $5x10^4$ parasitas Sylvio X10/4 pela via endovenosa. **(A)** Parasitemia patente observada na leitura em microscópio óptico. **(B)** Parasitemia subpatente estimada através de cultura em meio L.I.T. de alíquotas de 5 μl de sangue. **(C)** Parasitemia subpatente estimada por cultura em meio L.I.T. de alíquotas de 1 μl de sangue.

Com tais resultados, entendemos que haveria necessidade de modificar o modelo experimental para que as diferenças resultantes do tratamento com soros contendo IgM ou IgM/IgG fossem melhor visualizadas. Para tal, os animais foram infectados, e após 4 dias de infecção, tratados com os distintos pools de soros (soro controle, soro WT crônico e soro CD28KO crônico). Esta nova abordagem visava o contato direto dos anticorpos específicos inoculados com os parasitas que estariam sendo liberados à circulação por volta do 6º dia, contornando o direcionamento espontâneo do parasitas ao baço e fígado nos primeiros dias da infecção (saída espontânea).

Nesta nova abordagem, acompanhamos a parasitemia subpatente no 4º dia de infecção (previamente ao tratamento), e no 6º, 8º, 12º e 15º dia de infecção (após tratamento com soro WT normal, soro crônico de WT e soro crônico de CD28KO). Foi determinado o acompanhamento até o 15º dia, pois após esse período, os animais já sofreriam grandes influências em função dos anticorpos produzidos pelo próprio animal como resposta natural à infecção.

Ao término da terceira leitura das culturas com 5 μl de sangue (**Fig. 7, gráfico superior direito)**, todos os animais se mostraram positivos no 4º dia de infecção. No 6º dia de infecção (2º dia após tratamento), a presença da IgM/IgG levou a redução da parasitemia subpatente para menos de 20% de culturas positivas. Enquanto o grupo controle e o grupo tratado somente com IgM mantiveram 100% de positividade. Porém, no dia 8 p.i. e subsequentes, os animais tratados com soro contendo IgM se igualaram ao grupo tratado com soro contendo IgM/IgG, enquanto o grupo controle (que recebeu soro de animal não infectado), manteve alta porcentagem de positividade.

Diminuindo o volume de sangue nas culturas em meio LIT a positividade se limita aos dias 4º e 6º de infecção, e ao observarmos as culturas com volumes de sangue de 0,2 μl (**Fig. 7, gráficos inferiores**) é possível evidenciar a diferença entre os grupos experimentais. Assim, na segunda leitura das culturas em meio LIT com 0,2 μl observa-se que o grupo controle mantém alta positividade, enquanto que os animais tratados com soro imune de CD28KO apresentam por volta de 45% de positividade e o grupo tratado com soro imune de B6 mantém-se negativo.

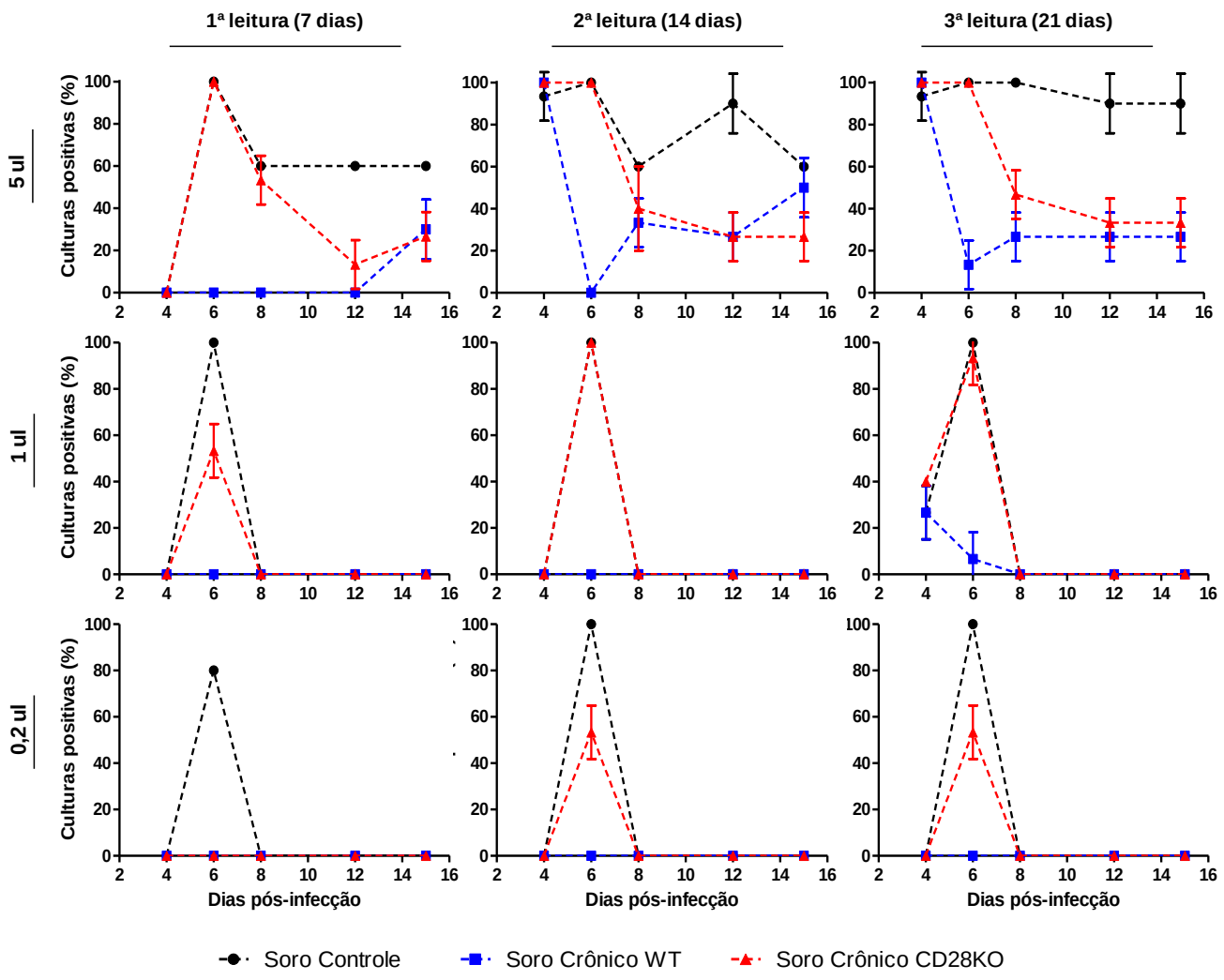

Figura 7. Análise da parasitemia subpatente de animais tratados com soros crônico de WT ou CD28KO. Camundongos C57BL/6 foram infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção: soro controle (ausente de anticorpos específicos), soro crônico WT (IgM e IgG específicas) e soro crônico CD28KO (somente IgM específica). Progressão horizontal: dias de leitura. Progressão vertical: volume de sangue utilizado na cultura.

As diferenças na frequência de culturas positivas (3ª leitura) entre os grupos diferentemente tratados podem ser observadas com mais detalhe ao confrontar cada grupo com os outros dois e verificando a existência de significância estatística. (**Fig. 8**). Os nossos resultados indicam que a IgG tem grande participação na retirada do *T. cruzi* da circulação, como já demonstrado em trabalhos anteriores. Como dado original, nossos resultados sugerem que a IgM específica também realiza essa função porém em menor magnitude.

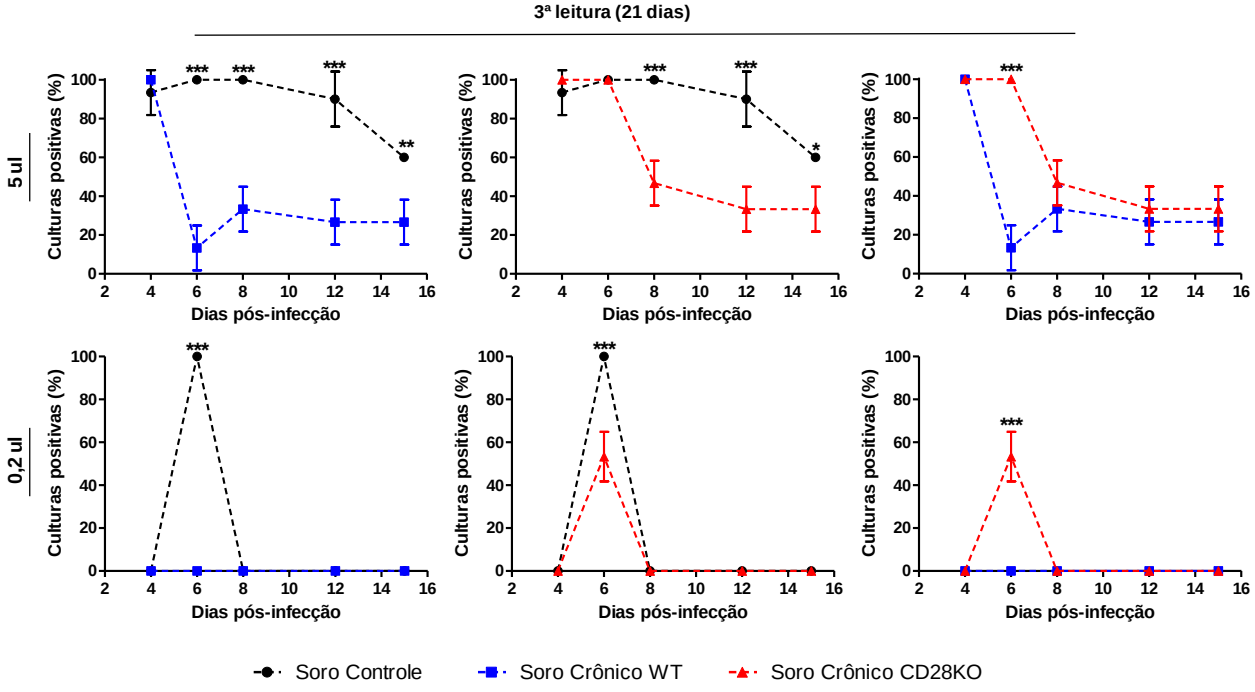

Figura 8. Análise de parasitemia subpatente de animais tratados com soro crônico de WT ou CD28KO, estimadas na terceira leitura (vigésimo primeiro dia) das culturas de sangue em meio L.I.T. Camundongos C57BL/6 foram infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção: soro controle (ausente de anticorpos específicos), soro crônico WT (IgM e IgG específicas) e soro crônico CD28KO (somente IgM específica). Progressão horizontal: dias de leitura. Progressão vertical: volume de sangue utilizado na cultura. ** p< 0,01; *** p<0.001.

O mesmo modelo experimental (animais tratados no 4º dia de infecção com 200 μl dos diferentes pools de soros) foi reproduzido para confirmar a remoção e para estimar o destino dos parasitas removidos. O experimento foi realizado na mesma forma que o anteriormente mostrado, porém com um número maior de animais (18), possibilitando que um grupo de animais fosse sacrificado no 6º dia e o restante dos animais, no 8º dia pós-infecção.

Como esperado, o grupo de animais tratados com soro contendo IgG/IgM apresentou uma grande remoção dos parasitas no 6º e 8º dia de infecção **(Fig. 9).** Já os animais tratados somente com soro contendo exclusivamente IgM apresentaram uma remoção mais discreta, porém, significativa quando comparada aos animais não tratados **(Fig. 10).**

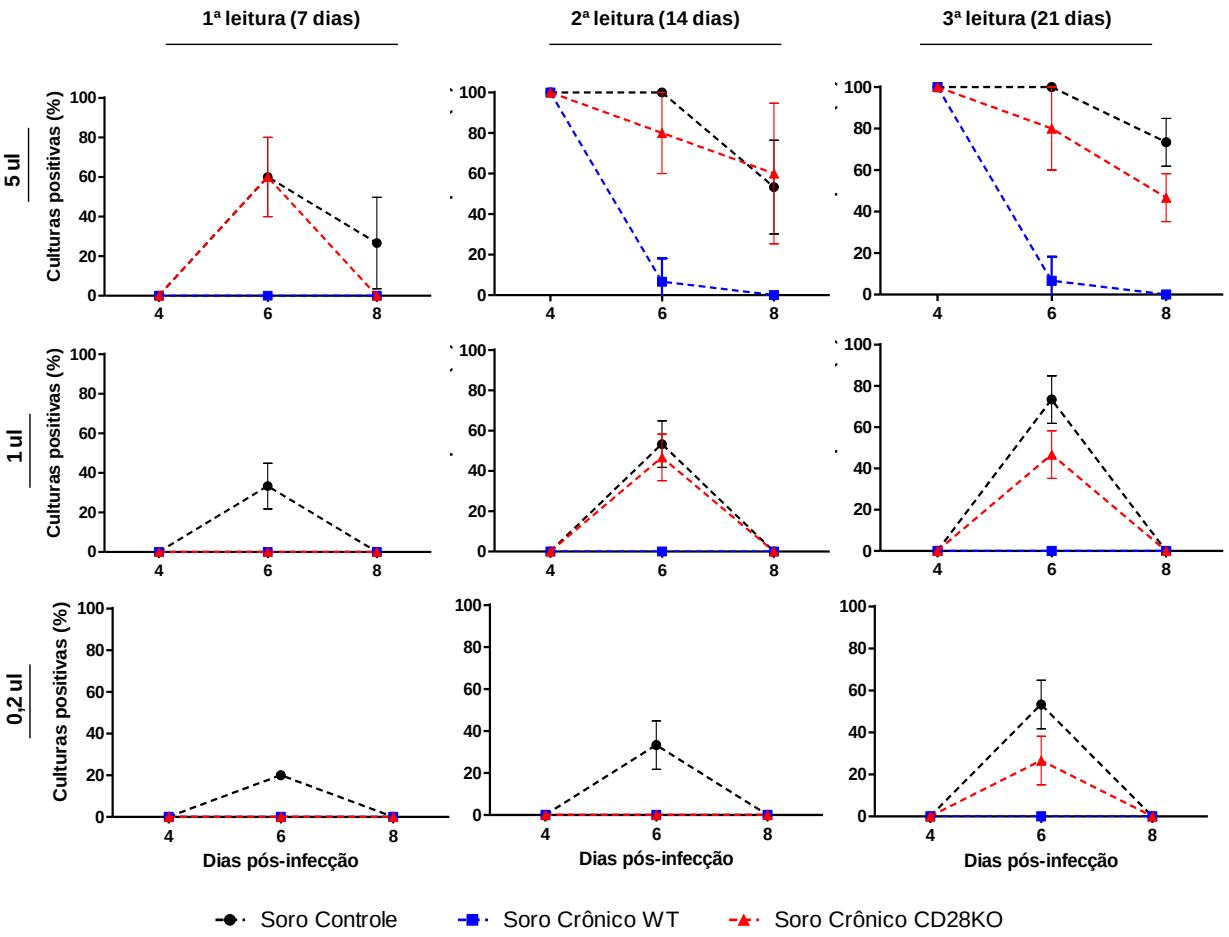

Figura 9. Análise de parasitemia subpatente de animais tratados com soro controle, ou soro crônico de camundongos WT ou CD28KO Camundongos C57BL/6 foram infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção: soro controle (ausente de anticorpos específicos), soro crônico WT (IgM e IgG específicas) e soro crônico CD28KO (somente IgM específica). Progressão horizontal: dias de leitura. Progressão vertical: volume de sangue utilizado na cultura. Um grupo de animais foi sacrificado no 6º dia pós-infecção e o restante no 8º dia.

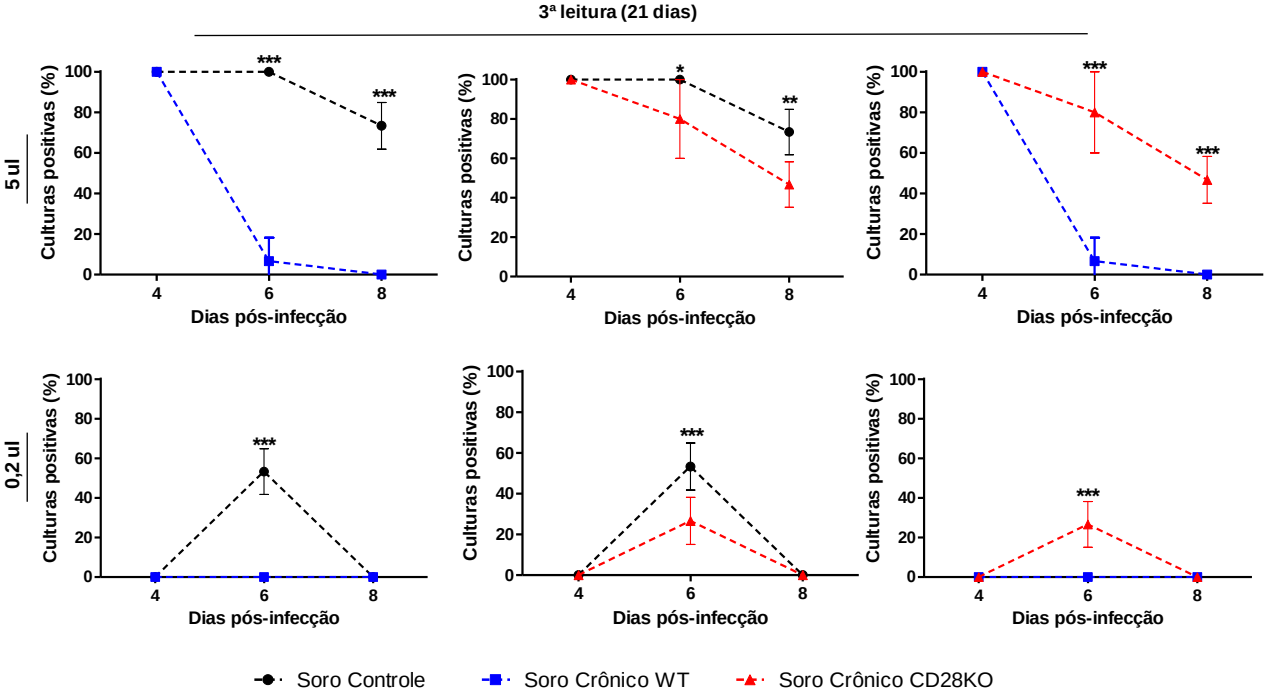

Figura 10. Análise de parasitemia subpatente de animais tratados com soro controle, ou soro crônico de camundongos WT ou CD28KO. Camundongos C57BL/6 foram infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção: soro controle (ausente de anticorpos específicos), soro crônico WT (IgM e IgG específicas) e soro crônico CD28KO (somente IgM específica). Progressão horizontal: dias de leitura. Progressão vertical: volume de sangue utilizado na cultura. Um grupo de animais foi sacrificado no 6º dia pós-infecção e o restante no 8º dia. * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0.001.

4.5 Análise da carga parasitaria no fígado, baço e pulmão de animais tratados no dia 4 p.i. com soros crônicos de camundongos WT ou CD28KO

Já em relação às culturas em meio LIT com alíquotas do macerado do fígado, baço e pulmão dos animais infectados e tratados com os diferentes soros e sacrificados nos dias 6º e 8º de infecção, não foram observadas diferenças no grau de positividade destas culturas em função do tratamento com os soros crônicos. Cabe ressaltar entretanto que somente avaliamos culturas com 5 μl do macerado do órgão, volume muito elevado que resultou em 100% de positividade para as culturas de fígado e baço. Confirmamos entretanto, como demonstrado anteriormente, que o baço e fígado são grandes receptores dos parasitas, enquanto o pulmão teria participação mais discreta **(Fig. 11).**

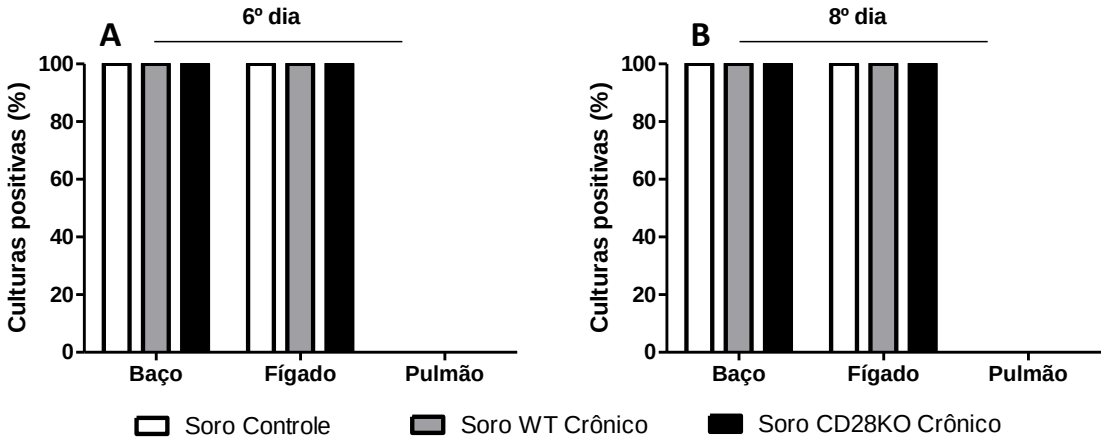

Figura 11. Carga parasitária no baço, fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção: soro controle (ausente de anticorpos específicos), soro crônico WT (IgM e IgG específicas) e soro crônico CD28KO (somente IgM específica). **(A)** 6º dia de infecção **(B)** 8º dia de infecção. A carga parasitária foi estimada pela positividade das culturas em meio LIT com alíquotas de 5 μL do macerado do órgão.

Não foram observadas grandes diferenças no grau de positividade de culturas em meio LIT no 6º e 8º dia de infecção. Como já demonstrado anteriormente, o baço e fígado são grandes receptores dos parasitas após sua internalização, enquanto o pulmão não seria um grande alvo neste inicio do processo. **(Fig. 11)**

Ao analisarmos a carga parasitária nestes órgãos por PCR Real-time, observamos, em forma análoga ao mostrado através das culturas em meio LIT (**Fig. 11)** que o pulmão apresenta a menor carga parasitária, quando comparado ao fígado e baço **(Fig. 12).** Enquanto, no fígado e baço observa-se um aumento considerável de parasitas do sexto para o oitavo dia de infecção, aumento que ocorre tanto nos animais que receberam soro WT controle como naqueles que receberam soros contendo IgM/IgG específicas, ou somente IgM.

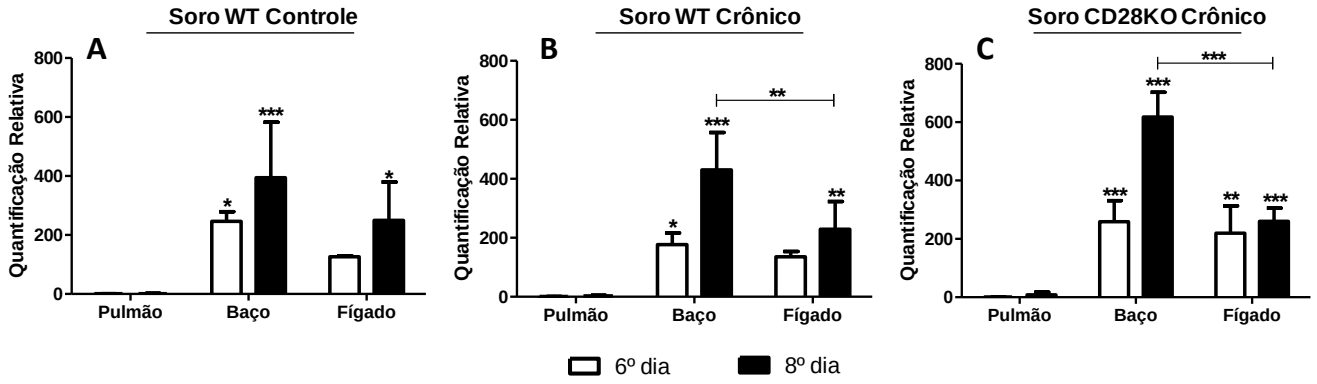

Figura 12. Quantificação relativa de *T. cruzi* (PCR Real time) de camundongos C57BL/6 infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção: soro controle (ausente de anticorpos específicos), soro crônico WT (IgM e IgG específicas) e soro crônico CD28KO (somente IgM específica). Comparação relativa ao pulmão, órgão sabidamente de menor carga parasitária. **(A)** Tratamento com soro WT controle **(B)** Soro WT Crônico **(C)** Soro CD28KO crônico. * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0.001. A carga parasitária foi estimada nos diferentes órgãos e tratamentos através os ΔΔCT dos PCRs nos diferentes órgãos e tratamentos em relação ao ΔCT no pulmão dos camundongos inoculados com soro WT controle.

Já a análise por separado de cada um dos órgãos é mostrada em relação à carga (no referido órgão) dos animais que receberam soro controle e se encontram no 6º dia de infecção. Esta análise mostrou que a carga parasitária no fígado e baço não sofre grandes mudanças em decorrência a administração dos soros crônicos, sendo a única constatação, um discreto aumento da carga parasitária do dia 6 p.i. para o dia 8 p.i. (**Fig. 13 A e B**).

No pulmão, entretanto, em relação aos animais que receberam soro WT controle, houve um aumento significativo da carga parasitária nos animais tratados com soro crônico WT, assim como nos animais tratados soro crônico CD28KO (**Fig. 13 C**). Esta observação foi constatada tanto no dia 6 p.i. como no dia 8 p.i.. Curiosamente, diferente do observado no fígado e baço, não houve qualquer aumento na carga parasitária do dia 6 p.i. para o dia 8 p.i..no pulmão dos animais tratados com soros crônicos.

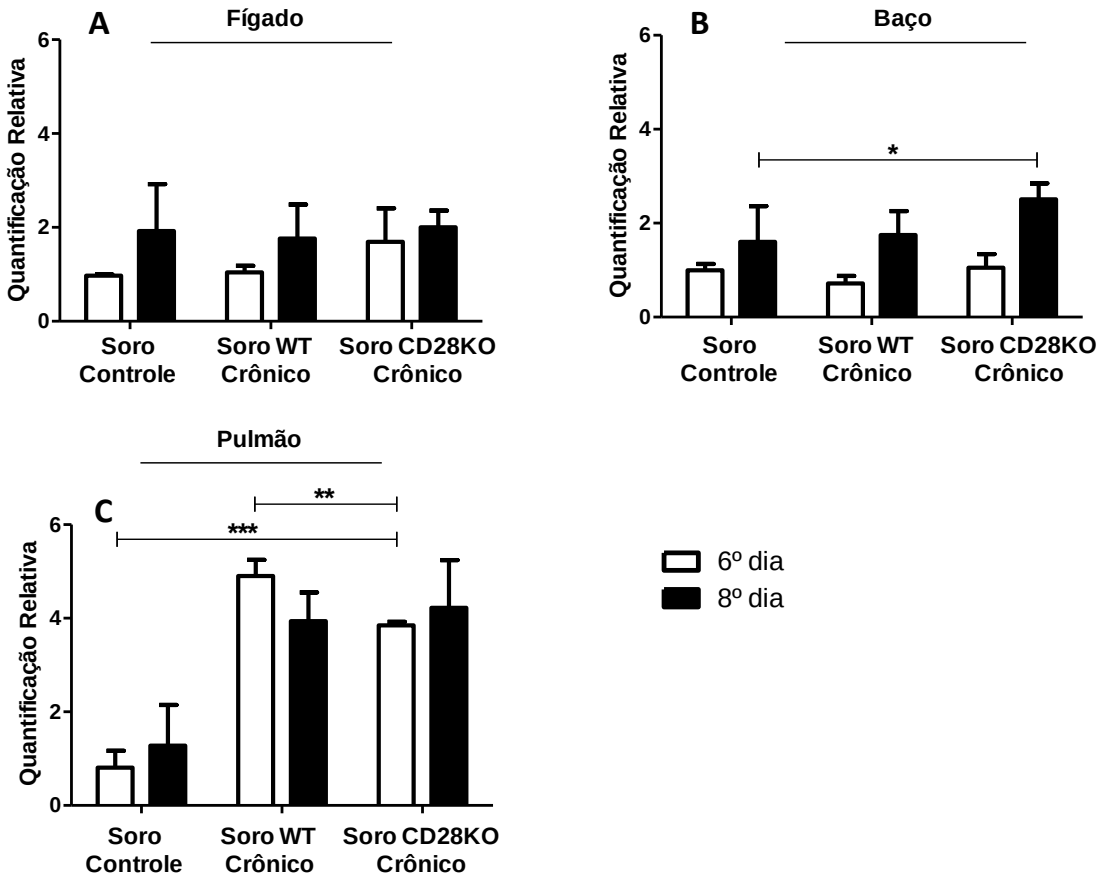

Figura 13. Quantificação relativa de *T. cruzi* (PCR Real time) de camundongos C57BL/6 infectados com $5x10^4$ parasitas via intravenosa e tratados com diferentes soros no 4º dia de infecção: soro controle (ausente de anticorpos específicos), soro crônico WT (IgM e IgG específicas) e soro crônico CD28KO (somente IgM específica). **(A)** Fígado **(B)** Baço **(C)** Pulmão. * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0.001. A carga parasitária é mostrada separadamente nos diferentes órgãos em relação (ΔΔCT) ao ΔCT no referido órgão dos camundongos inoculados com soro WT controle.

4.6 Análise da remoção de tripomastigotas da cepa Y do sangue por soro imune de camundongo CD28KO (infectado por parasitas Sylvio X10/4)

A ausência de mudanças significativas no fígado e baço dos animais inoculados com *T. cruzi* Sylvio X10/4 que receberam no dia 4 p.i. soro crônico WT ou CD28KO pode ser interpretada como decorrente do alto nível basal de parasitismo já existente nestes órgãos, consequente à remoção espontânea dos parasitas logo após serem inoculados. Para contornar esta remoção espontânea do *T. cruzi* Sylvio X10/4 pensamos em testar a capacidade de remoção por soro crônico de camundongos CD28KO (infectados por parasitas Sylvio X10/4) no

modelo de remoção de *T. cruzi* da cepa Y que tinha sido utilizado nos trabalhos de Umekita el al. (Umekita, Takehara, & Mota, 1988) ao descreverem o “clearance imune” por IgG de tripomastigotas sanguícolas.

Para esta nova abordagem precisávamos verificar, entretanto, se o soro crônico de camundongos CD28KO infectados por parasitas Sylvio X10/4 reconheceria parasitas da cepa Y. A análise por ELISA mostrou que o antígeno de tripomastigotas de cultura da cepa Y é fortemente reconhecido pela IgM presente nos soros obtidos de animais WT e CD28KO. Em relação à IgG no soro crônico WT, observamos, entretanto, pouca reatividade frente a antígeno da cepa Y (**Fig. 14B**).

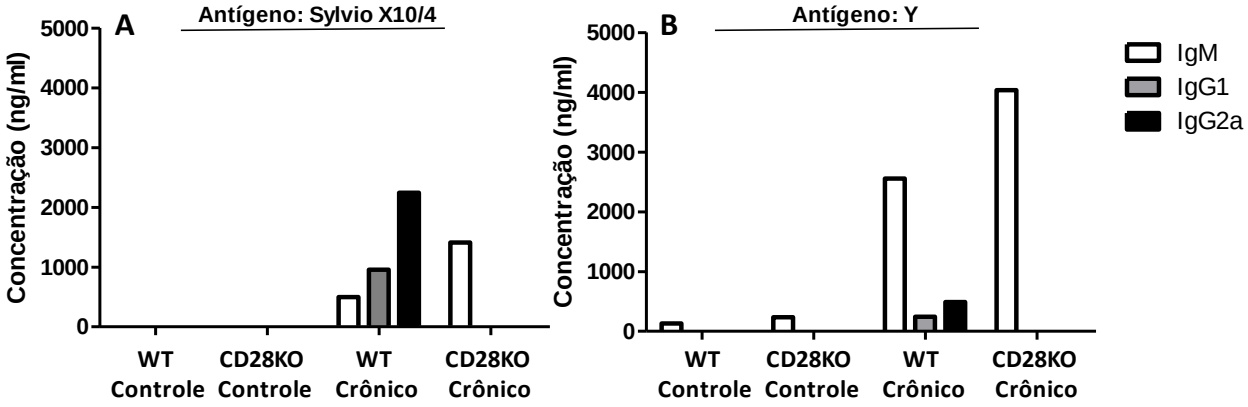

Figura 14. Análise por ELISA da reatividade frente a antígeno de *T. cruzi* das cepas Sylvio X10/4 e Y em pools de soros obtidos de camundongos WT e CD28KO controles e camundongos WT e CD28KO na fase crônica da infecção por parasitas Sylvio X10/4. **(A)** Antígeno Sylvio X10/4. **(B)** Antígeno Y.

Após comprovarmos por ELISA a reatividade dos soros anti-Sylvio X10/4 frente a antígeno de parasitas Y, estudamos a remoção *in vivo* de parasitas desta última cepa pelos soros crônicos WT e CD28KO. Para tal, um grupo de 18 camundongos C57Bl/6 foi infectado pela via endovenosa com $2x10^6$ parasitas Y livres de anticorpos (obtidos de animais infectados e tratados com ciclofosfamida). Após 15 minutos de infecção, os animais foram divididos em 4 grupos que foram respectivamente tratados i.v. com 200 μl de soro WT controle, ou soro WT crônico (de animais infectados por parasitas Sylvio X10/4), ou soro CD28KO crônico (de animais infectados por parasitas Sylvio X10/4) ou soro crônico (de animais infectados por parasitas Y), e a parasitemia patente dos animais infectados avaliada 10, 30, 60, 120 minutos e 24 horas após a inoculação dos soros. **(Fig. 15A)**

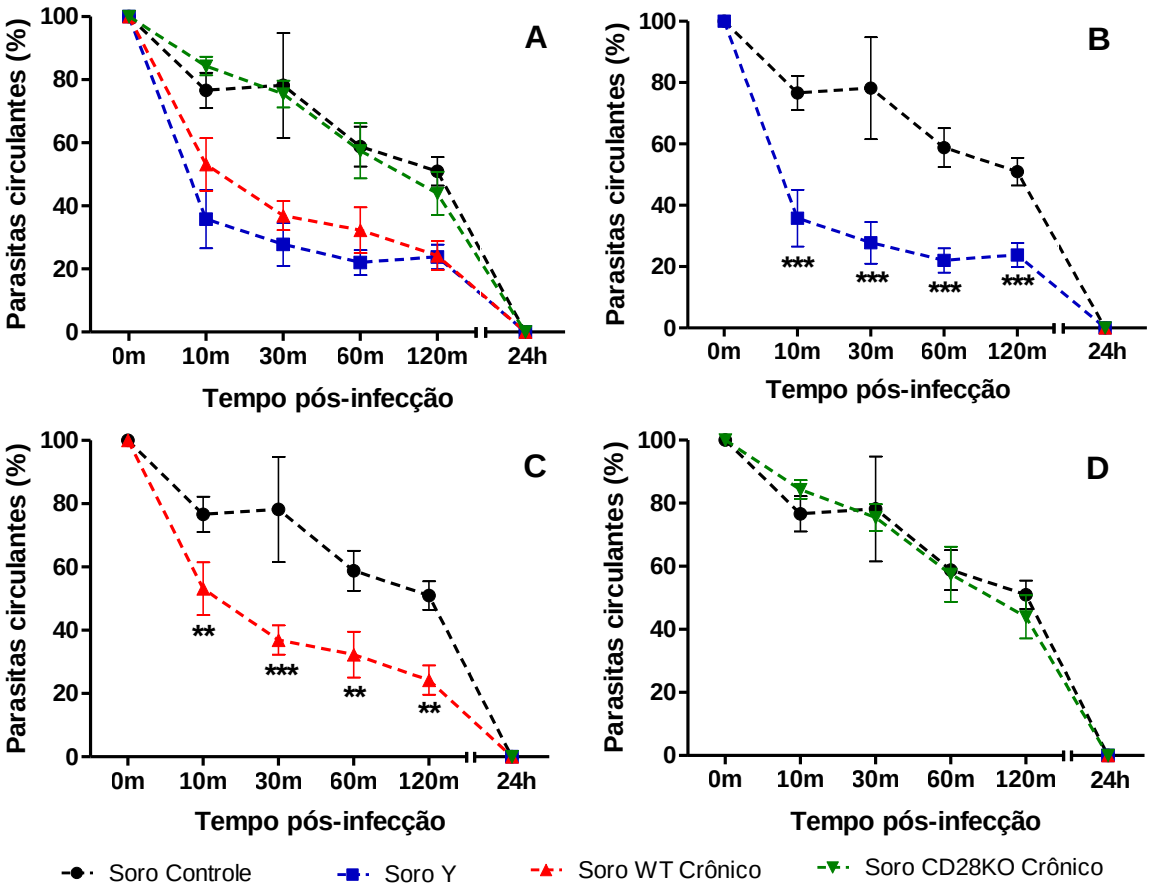

Figura 15. Curvas de parasitemia patente em animais inoculados i.v. com parasitas da cepa Y livres de anticorpos e a seguir inoculados com soros controles ou crônicos de camundongos WT e CD28KO. Os animais foram infectados com $2x10^6$ tripomastigotas obtidos de animais infectados e tratados com ciclofosfamida, suprimindo a produção de anticorpos. Após 15 minutos de infecção, os animais foram tratados com 200 ul de diferentes soros (soro controle, soro de WT crônico e CD28KO com Sylvio X10/4, soro crônico com Y) e a curva de saída foi avaliada a 10, 30, 60, 120 minutos e 24 horas após o tratamento. **(A)** Curva de saída de todos os tratamentos. **(B)** Soro controle versus soro crônico de Y. **(C)** Soro controle versus soro WT crônico de Sylvio X10/4. **(D)** Soro controle versus soro CD28KO crônico de Sylvio X10/4. ** p< 0,01; *** p<0.001

Como demonstrado pelo grupo de Umekita, o soro imune WT frente a Y é eficaz na remoção de parasitas, no nosso experimento, sendo capaz de retirar 60% dos parasitas da circulação nos 10 primeiros minutos. **(Fig. 15B)** O mesmo resultado pode ser observado no tratamento com soro imune WT frente a Sylvio X10/4. **(Fig. 15C)** O soro imune de camundongos CD28KO, contendo somente IgM especificas frente a Sylvio X10/4, não demonstrou diferenças quando comparado ao soro controle. **(Fig. 15D**).

4.7 Avaliação *in vitro* da interação de células da linhagem macrofágica e anticorpos específicos contra parasitas Sylvio X10/4

Além dos experimentos *in vivo*, também foram realizados experimentos *in vitro* para analisar a interação direta entre os macrófagos, os soros crônicos B6 e CD28KO e o parasita. Na maior parte dos experimentos utilizamos macrófagos diferenciados precursores contidos na medula óssea estimulados com sobrenadante contendo M-CSF. Para avaliar a melhor proporção parasita-macrófago para a infecção *in vitro*, foram testadas três proporções distintas (0,5:1 / 1:1 / 2:1), sendo constatado que nas duas primeiras proporções não houve um grande aumento de células infectadas durante as 72 horas de culturas, não alcançando 20%. Já na proporção 2:1, a porcentagem de células infectadas foi por volta de 50% às 72 horas. (**Fig. 16 A**). O tratamento dos macrófagos com IFN-γ confirmou que esta citocina é importante no controle da infecção pelo *T. cruzi*, proporcionando uma maior ativação aos macrófagos, e a consequente redução na porcentagem de células infectadas que é evidenciada claramente na proporção 2:1, onde o tratamento com IFN-γ reduz a frequência de macrófagos infectados às 72 horas para 20%. (**Fig. 16 B**)

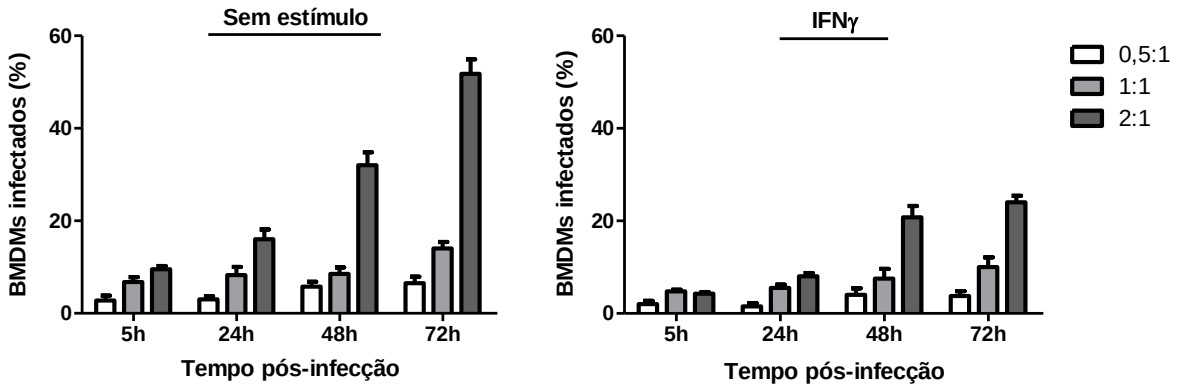

Figura 16. Caracterização da infecção em diferentes proporções parasita-macrófago (diferenciados a partir de precursores da medula óssea). **(A)** Porcentagem de infecção em macrófagos não estimulados. **(B)** Porcentagem de infecção em macrófagos pré-tratados com IFNγ.

O próximo passo foi estudar a importância dos soros WT crônico e CD28KO crônico na internalização e sobrevivência do parasita em macrófagos. Para isso, os macrófagos derivados de medula óssea foram mantidos durante o período de

infecção na presença dos diferentes soros (soro controle, soro crônico contendo IgM e IgG; soro crônico contendo somente IgM). Observou-se um maior número de macrófagos infectados nas culturas que continham anticorpos, sendo encontrada a maior taxa de infecção no grupo incubado com soro contendo IgM e IgG.

Contudo, a taxa de infecção dos macrófagos foi também aumentada na presença de soro imune de camundongos CD28KO, resultado que sugere a presença neste soro de algum elemento (provavelmente a IgM específica) que direta ou indiretamente facilita a internalização do parasita. Porém, após as 72 horas de cultura ocorreu um equilíbrio na porcentagem de células infectadas, independente do tratamento (**Fig. 17 A**).

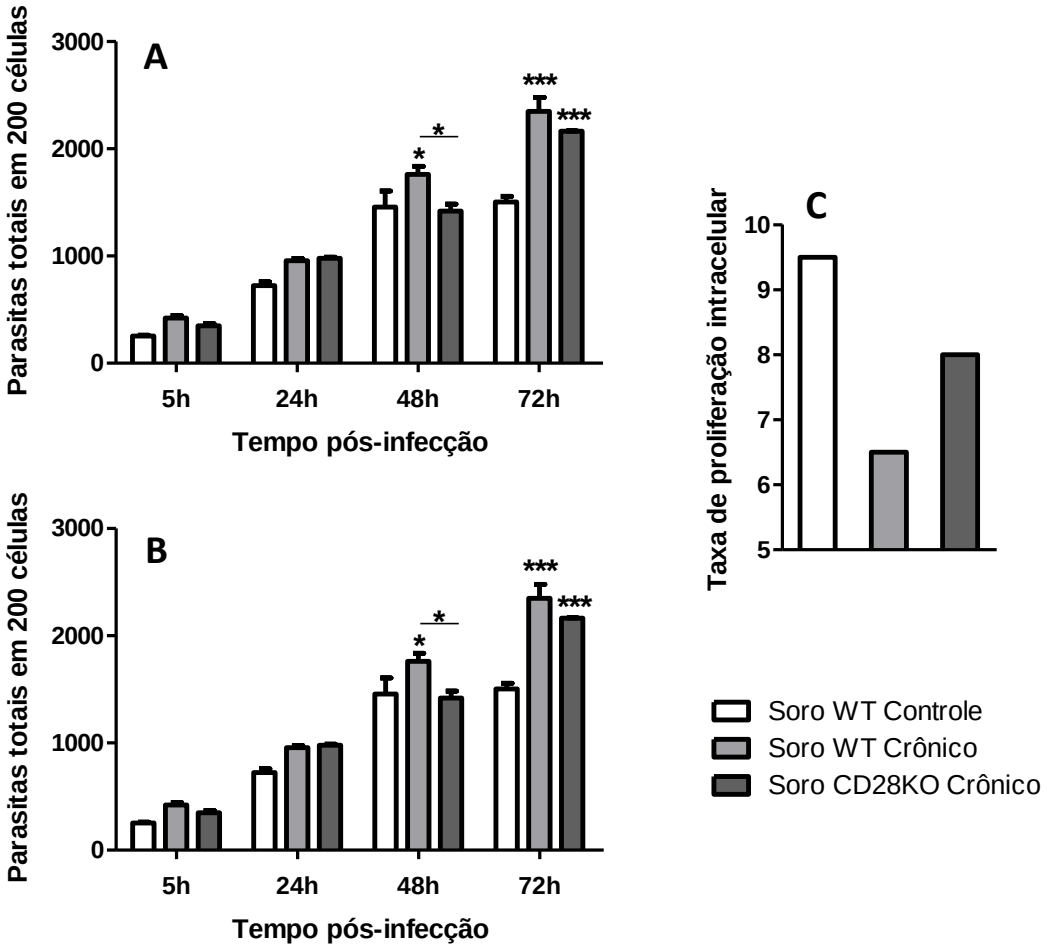

Figura 17. Papel dos soros de camundongos WT e CD28KO crônicos na internalização e sobrevivência dos parasitas Sylvio X10/4 em macrófagos derivados da medula óssea. **(A)** Porcentagem de macrófagos infectados. **(B)** Número total de parasitas em 200 macrófagos. **(C)** Taxa de proliferação intracelular do parasita. * $p<0,05$; *** $p<0.001$.

Com relação ao número de parasitas em 200 células infectadas, a presença nas culturas dos soros crônicos WT e CD28KO resultou em um maior número de parasitas, diferença que atingiu significância às 72 horas de cultura (**Fig. 17 B**).

Por outro lado, no que se diz respeito ao índice de proliferação intracelular do parasita (razão entre o número de parasitas totais após 72 horas de infecção e o número inicial de parasitas totais após 5 horas de infecção), nossos resultados mostram que os soros contendo anticorpos específicos providenciaram um maior controle intracelular da infecção, uma vez que na presença destes se observa uma menor taxa de proliferação comparada àquela dos macrófagos não tratados. Contudo, o tratamento com soro crônico WT (que contém IgG/IgM) resultou em menor índice de proliferação do que o observado na presença de soro contendo exclusivamente IgM (**Fig. 17 C**).

Apesar dos baixos níveis detectados, os macrófagos infectados na presença de soro WT crônico apresentaram maior produção de óxido nítrico quando comparado às demais culturas (**Fig. 18).**

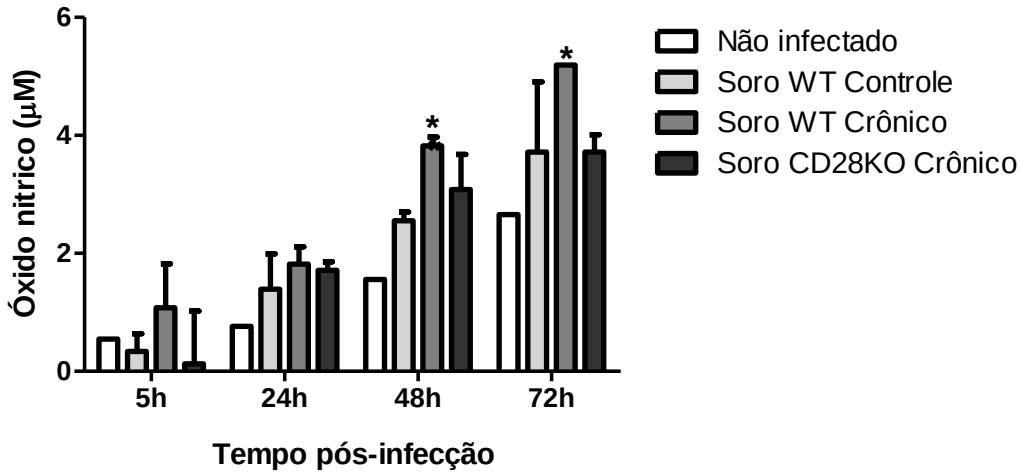

Figura 18. Quantificação de óxido nítrico por Reagente de Griess em sobrenadantes de culturas de macrófagos diferenciados da medula óssea que foram infectados por parasitas Sylvio X10/4 na presença de soros WT e CD28KO crônicos. * $p<0,05$

Os experimentos de interação *T. cruzi*-macrófago foram também realizados com macrófagos do peritônio, obtidos após estimulação local durante 4 dias com PBS 1x amido 1%. Este modelo foi escolhido, pois macrófagos elicitados do peritônio apresentam maior perfil inflamatório quando comparados a macrófagos diferenciados a partir de precursores da medula óssea. Os resultados com macrófagos peritoneais foram similares aos obtidos com macrófagos derivados de

medula, com exceção da taxa de proliferação intracelular, onde não foi observada diferença entre os tratamentos com soros contendo IgM e IgM/IgG.. (**Fig. 19**)

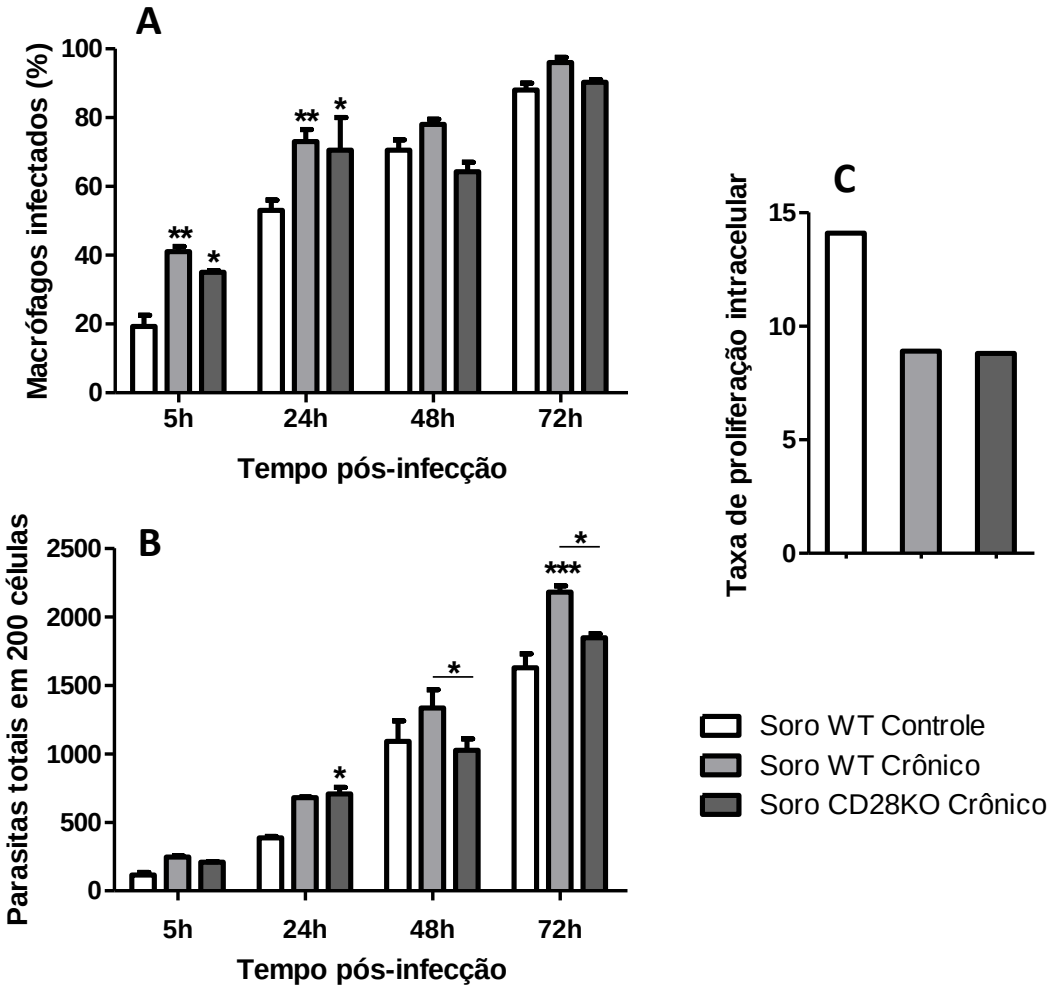

Figura 19. Papel dos soros de camundongos WT e CD28KO crônicos na internalização e sobrevivência dos parasitas em macrófagos peritoneais. **(A)** Porcentagem de infecção em 200 macrófagos. **(B)** Número total de parasitas em 200 macrófagos. **(C)** Taxa de proliferação intracelular do parasita (razão entre o número total de parasitas em 200 células às 72 horas de infecção e o número total de parasitas às 5 horas de infecção). * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0.001.

Para avaliar se o potencial de remoção do *T. cruzi* apresentado pelo soro crônico CD28KO estaria ligado a sua capacidade de ativar o sistema complemento, os soros foram incubados a 56 ºC por 30 minutos (para inativação do complemento), antes de realizar o tratamento. A inativação do soro crônico CD28KO resultou na perda da sua capacidade opsonizadora, sendo incapaz que promover a internalização do parasita Sylvio X10/4 pelos macrófagos após 5 h de cultura. Este resultado indica a possível participação do complemento no processo de

internalização mediado pelo soro contendo exclusivamente IgM **(Fig. 20A)**. Contudo, às 24h da cultura, mas não em tempos posteriores, o soro CD28KO crônico inativado mostrou alguma atividade opsonizadora. Diferentemente deste soro, o soro crônico WT manteve a sua capacidade de promover a internalização do parasita após ser inativado.

Com relação ao número de parasitas totais, não foram visualizadas grandes diferenças dos resultados com soro crônico CD28KO inativado e aqueles com soro ativo **(Fig. 20 B e C)**

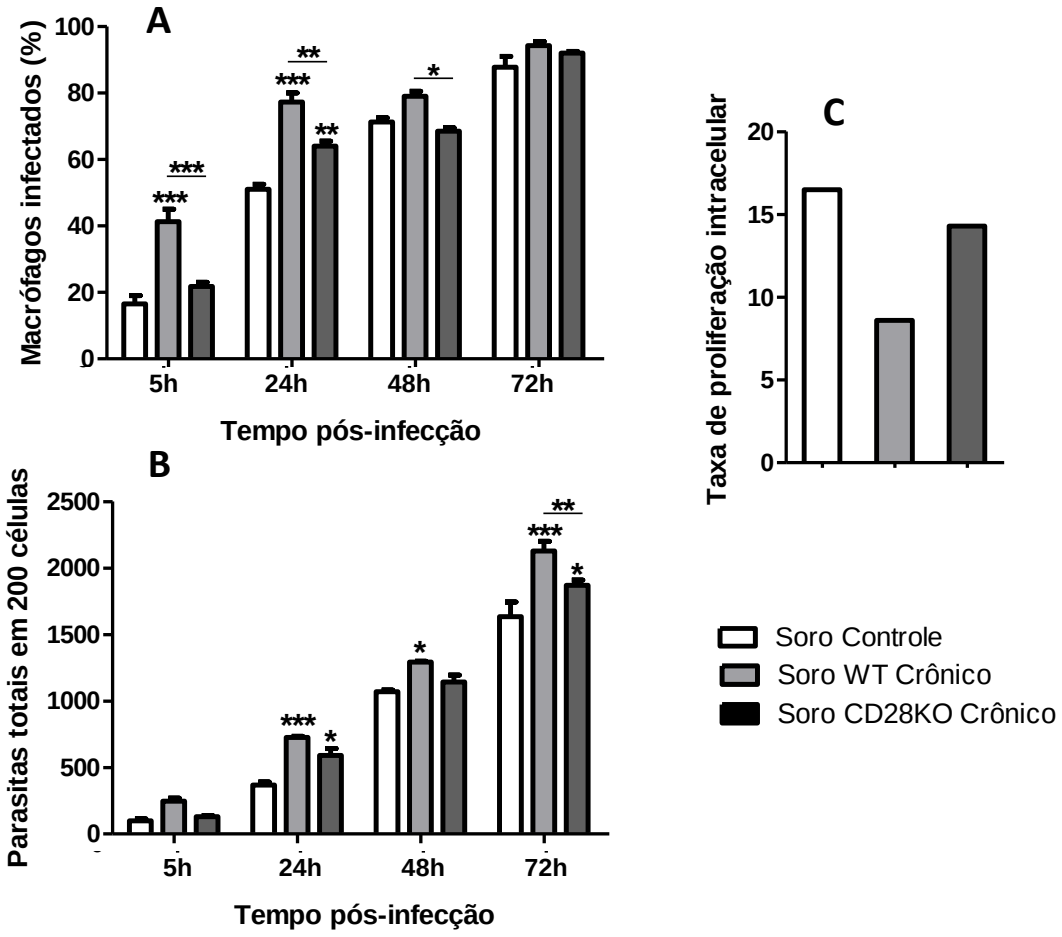

Figura 20. Participação do sistema do complemento: Internalização e sobrevivência de parasitas Sylvio X10/4 em macrófagos (diferenciados da medula óssea) na presença de soros crônicos WT e CD28KO pré-aquecidos por 30 minutos a 56ºC **(A)** Porcentagem de infecção em 200 macrófagos. **(B)** Número total de parasitas em 200 macrófagos. **(C)** Taxa de proliferação intracelular do parasita (razão entre o número total de parasitas em 200 células às 72 horas de infecção e o número total de parasitas às 5 horas de infecção). * p<0,05; ** p< 0,01; *** p<0.001.

O conjunto destes resultados *in vitro* corrobora com os nossos achados nos experimentos *in vivo*, revelando, além da clara participação do soro crônico WT (contendo IgG) na remoção dos parasitas, uma atuação significativa do soro crônico CD28KO (contendo exclusivamente IgM) neste processo. Mais ainda, resultados preliminares nos permitem cogitar que, analogamente ao demonstrado *in vivo* para a IgG específica, a papel opsonizador da IgM específica operaria através da ativação do sistema complemento.

5 DISCUSSÃO

Buscando uma visão mais abrangente e clara do papel do sistema imune na infecção pelo *T. cruzi*, foi escolhido o clone Sylvio X10/4, parasita de baixa virulência (sabidamente miotrópico, causador de miocardiopatia crônica em animais C3H/HePAS) para analisar a interação do *T. cruzi* com células da linhagem macrofágica na presença de soros imunes contendo anticorpos específicos das classes IgM e/ou IgM/IgG. Como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (MARINHO et al., 2007), animais C57BL/6 imunocompetentes desenvolvem uma forte resposta humoral dominada por anticorpos da classe IgG2a. Já os animais C57BL/6 deficientes na molécula co-estimulatória CD28 (necessária para a mudança, “switch”, da classe de anticorpos) fazem resposta humoral restrita a anticorpos da classe IgM, característica que possibilita o estudo da ação individualizada desta classe de anticorpo.

Experiências anteriores do laboratório (G. Giacomini, Dissertação de mestrado, 2012) mostraram que tripomastigotas Sylvio X10/4 inoculados iv em camundongos C57BL/6 sofrem uma saída rápida do sangue, em tal forma que após 1 hora poucos parasitas permanecem ainda na circulação. No presente trabalho de mestrado, os dois primeiros experimentos visavam identificar os órgãos-alvo onde se encontrariam os parasitas inoculados após saírem da corrente sanguínea, assim como o eventual papel dos anticorpos específicos modificando este processo. Para a nossa surpresa, nestes primeiros experimentos observamos que a presença de soro imune (contendo IgM ou IgM/IgG específicas) não alterou significativamente o destino dos tripomastigotas que deixaram o sangue, se comparada à saída espontânea na ausência de anticorpos específicos. Contudo, foi possível observar que, independentemente do tratamento, os parasitas inoculados eram encontrados no fígado e baço, e, em menor intensidade, no pulmão às 18 horas da sua inoculação. Estes dados contrastam com o reconhecido miotropismo deste clone de *T. cruzi* e sugerem que não se trate de invasão, mas de remoção ativa.

Trabalhos anteriores do nosso grupo já demonstraram o papel importante do fígado na remoção por soro imune de parasitas da cepa Y (reticulotrópica e mais virulenta) (SARDINHA et al., 2010). Nas experiências com parasitas Sylvio X10/4, entretanto, não foi possível definir diferenças entre os diferentes tratamentos com relação à carga parasitária nos órgãos. Analogamente, nenhuma diferença foi

observada no estudo histopatológico, o que poderia ser, entretanto, explicado pelo curto tempo de infecção (18 horas), muito precoce para a visualização de infiltrados hepáticos e pulmonares.

Após estes resultados inesperados, decidimos avaliar se o processo de saída espontânea dos parasitas inoculados poderia ser imputado à sua remoção por células da linhagem macrofágica. A eliminação de macrófagos e células dendríticas dos animais C57BL/6 pelo tratamento com lipossoma de clodronato determinou persistência da parasitemia patente até duas horas após a inoculação dos parasitas, diferentemente dos animais não tratados, que em nenhum momento mostraram parasitemia patente significativa. Tais resultados foram confirmados na avaliação da parasitemia subpatente, avaliação na qual os animais tratados com clodronato se mantiveram positivos do primeiro dia de infecção ao décimo quinto dia (ultimo dia analisado). Já o grupo controle (não tratado), a parasitemia subpatente positivou somente no sexto dia de infecção e manteve um nível de positividade inferior à do grupo tratado até o ultimo dia testado. A dificuldade no controle da parasitemia dos animais tratados com clodronato deve estar relacionada à ausência de macrófagos no baço, assim como de células de Kupffer no fígado e dos macrófagos alveolares do pulmão, deixando claro, a importância da linhagem macrofágica na remoção espontâneo da circulação de parasitas recém-inoculados.

O próximo passo foi entender melhor como o parasita normalmente se comporta nos dias subsequentes à infecção. Como relatado, a parasitemia patente não pôde ser observada horas após a infecção pela via endovenosa. Interessantemente, como indicado acima, observamos um pico de positividade da parasitemia subpatente no 6ª dia de infecção, com redução gradual ao decorrer dos dias. Esta observação nos leva a acreditar que esta positividade se refere aos parasitas que sobreviveram à primeira remoção realizada pelas células fagocíticas e eventualmente por outras células, que, após realizarem um primeiro ciclo de replicação intracelular, retornaram à circulação. Este resultado nos possibilitou uma nova abordagem experimental para avaliar o efeito dos soros contendo IgM ou IgM/IgG. Neste novo protocolo, os camundongos C57BL/6 foram tratados com soro normal ou soro imune crônico B6-IMS ou CD28KO-IMS no 4º dia de infecção, para que os parasitas que retornassem a corrente sanguínea em maior quantidade por volta do 6º dia encontrassem os anticorpos na circulação.

Os animais tratados com B6-IMS (IgM/IgG) mostraram uma enorme redução de positividade quando comparada aos outros grupos, se mantendo reduzida até o ultimo dia testado. A participação da IgG no remoção de parasitas Sylvio X10/4 não é surpreendente, uma vez que já havia sido demonstrada em estudos com parasitas da cepa Y (UMEKITA; TAKEHARA; MOTA, 1988). Devido à rapidez da resposta exercida, sua ação deve ser baseada na interação direta dos anticorpos com receptores Fcγ, e, eventualmente receptores para complemento, na superfície de macrófagos, resultando em uma internalização ágil e eficaz.

Ao analisar o comportamento dos animais tratados com soro contendo somente IgM, observa-se uma queda mais tardia na parasitemia, que também se manteve reduzida até o ultimo dia testado com uma positividade ligeiramente superior à do grupo tratado com soro contendo IgM/IgG. Estes resultados sugerem atuação da IgM como ativadora do sistema complemento, papel altamente discutido e comprovado em estudos publicados. Estudos adicionais precisam ser realizados para concluir se a participação da IgM se reduz a ativação do complemento, ou se opera de uma maneira mais direta.

Para uma melhor compreensão dos resultados, o experimento foi repetido com um número maior de animais, possibilitando o sacrifício destes no 6º e 8º dia de infecção. Esta experiência confirmou os resultados anteriores que sugerem a importância da IgM específica na remoção dos parasitas do sangue. A análise por PCR em tempo real dos órgãos mostrou que o fígado e baço apresentam maior carga parasitária do que o pulmão. Contudo, nestes dois órgãos a carga parasitária exibiu pouca diferença entre os tratamentos, e mostrou aumento do 6º ao 8º dia de infecção. Curiosamente, diferente do fígado e baço, no pulmão observamos uma remoção significativa de parasitas nos grupos tratados com B6-IMS ou CD28KO-IMS quando comparado ao grupo tratado com soro controle. Tais resultados nos permitem cogitar que o fato do pulmão não ser um órgão alvo da saída espontânea dos parasitas permite observar maiores diferenças após os tratamentos com soros crônicos. Mais ainda, a ausência de aumento da carga parasitária pulmonar do 6° para o 8° dia de infecção nos animais tratados com B6-IMS ou CD28KO-IMS sugere que neste órgão a remoção imune dos parasitas resulta na eliminação de parte dos parasitas.

Frente à “remoção espontânea” sofrida pelos parasitas Sylvio X10/4, decidimos utilizar um modelo de infecção com a cepa Y, parasita que permanece por

mais tempo na circulação, para verificar o potencial dos anticorpos específicos. Para tal, inicialmente, testamos a reatividade dos soros obtidos na infecção por Sylvio X10/4 frente a antígeno obtido de parasitas da cepa Y. A análise do ELISA demonstrou uma grande reatividade entre anticorpos da classe IgM, e de maneira mais discreta com relação aos anticorpos da classe IgG. Tais resultados possibilitaram a realização do experimento de remoção do *T. cruzi in vivo*, no qual, como controle positivo, utilizamos o soro imune de animais infectados por parasitas da cepa Y , que sabidamente é eficaz na remoção destes parasitas, como demonstrado por Umekita e cols (UMEKITA; TAKEHARA; MOTA, 1988)

Como esperado, o soro imune frente a *T. cruzi* da cepa Y, assim como o B6-IMS frente ao *T. cruzi* Sylvio X10/4 determinaram uma redução bastante significativa dos parasitas na circulação. Surpreendentemente, o grupo controle apresentou certa queda durante as leituras, resultado inesperado que pode estar relacionado a não suplementação do PBS utilizado para ressuspensão dos parasitas com soro fetal bovino, reduzindo assim a viabilidade e virulência dos parasitas. Mais importante, este comportamento, impossibilitou observar diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado com CD28KO-IMS, que já teve participação parcial comprovada na remoção de parasitas nos resultados apresentados acima. Desta forma, acreditamos que este experimento termina inconclusivo, necessitando de repetição e melhor padronização para resultados confiáveis. Os resultados observados nas experiências *in vivo* foram reproduzidos nos experimentos *in vitro*, onde a internalização de parasitas por macrófagos derivados da medula óssea foi superior na presença de anticorpos, com pequena superioridade do tratamento com IgG. Este fenômeno mostrou-se evidente após 5 horas de infecção, porém começa a se igualar ao controle às 72 horas, inibição que pode ser atribuída aos eventuais efeitos da opsonização aumentando a atividade tripanocida do meio intracelular dos macrófagos.

Assim, dois fenômenos distintos poderiam estar acontecendo. Nos primeiros momentos, devido a maior internalização, as células tratadas com soros imunes apresentariam maior quantidade de parasitas intracelulares. Porém, ao avaliar a taxa de proliferação intracelular do parasita (relação do número de parasitas às 72 horas/ número de parasitas no tempo 5 horas), constata-se que além do papel na internalização, os anticorpos parecem promover maior proteção, induzindo uma maior ativação dos fagócitos e resultando em um controle da infecção mais eficaz.

Apesar desta constatação, não foi possível relacioná-la com a ação do óxido nítrico, já que foram detectados níveis muito baixos de produção deste radical. Tal resultado pode estar relacionado ao fato do clone Sylvio X10/4 não ser um potente indutor de produção de óxido nítrico em macrófagos derivados da medula óssea.

Para esclarecer a via pela qual a IgM atuaria durante a remoção, os soros utilizados foram incubados a 56ºC durante meia hora, para a inativação dos elementos do sistema complemento. Os resultados demonstram uma redução na internalização dos parasitas, indicando que, como esperado, grande parte do efeito opsonizador da IgM deve estar relacionado à ativação do sistema complemento, porém, sem ser possível concluir que seu papel esteja estritamente limitado a essa participação. Contudo, o estudo da participação do complemento *in vitro* tem como limitação o fato dos próprios macrófagos sintetizarem pequenas quantidades destas moléculas.

O conjunto dos resultados obtidos *in vivo* e in *vitro* nos permite concluir que as células da linhagem macrofágica tem papel crucial na remoção espontânea de parasitas circulantes. Mais ainda, nossos resultados sugerem que a remoção do parasita é potencializada pela presença de anticorpos específicos, não somente daqueles da classe IgG, mas também daqueles da classe IgM. Experimentos adicionais são necessários para evidenciar as moléculas envolvidas nesse reconhecimento, afim de revelar as consequências nos diferentes órgãos-alvo dos parasitas internalizados de maneiras distintas.

6 CONCLUSÕES

- As células da linhagem macrofágica possuem papel importante na “remoção” espontânea de parasitas Sylvio X10/4 da circulação, uma vez que esta é inibida após tratamento com lipossomos contendo clodronato.

- O soro de camundongo WT crônico, que contém anticorpos específicos das classes IgG, e IgM, otimiza o processo de internalização *in vivo* do parasita;

- O soro imune de camundongo CD28KO, que contém exclusivamente IgM específica, também potencializa a remoção *in vivo* do *T. cruzi* , porém em menor escala que o soro imune de camundongos B6;

- Nos animais recém-infectados pela via endovenosa, o fígado e o baço, e em menor grau o pulmão, parecem ser responsáveis pela saída dos parasitas do sangue, mesmo na ausência de anticorpos específicos.

- Na presença de soros imunes de camundongos WT e CD28KO, macrófagos derivados da medula óssea ou induzidos no peritônio exibem aumento da internalização de parasitas Sylvio X10/4 *in vitro*.

REFERÊNCIAS*

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 593-623, 1999.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 177, p. 3515-3519, 2006.

BORGES, C. R. et al. Role of nitric oxide in the development of cardiac lesions during the acute phase of experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, p. 170-174, 2009.

CAMPAGNE, M.; WIESMANN, C.; BROWN, E. Macrophage complement receptors and phatogen clearance. **Cell. Microb.**, v. 9, p. 2095-2102, 2007.

CESTARI, I. S. et al. Role of early lectin pathway activation in the complement-mediated killing of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Immunology**, v. 47, p. 426-437, 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Trop.**, v. 15, p. 5-13, 2010.

EL BOUHDIDI, A. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. **Parasite Immunol.**, v. 16, n. 2, p. 69-76, 1994.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **F.E.M.S. Microbil. Rev.**, v. 36, p. 734-747, 2012.

GONÇALVES, V. M. et al. NLRP3 controls *Trypanosoma cruzi* infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, 2013.

GIACOMINI, G. A infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio X10/4: envolvimento do sistema imune no controle da parasitemia. [**dissertação** (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

---

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

GRAVINA, H. D. et al. Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. **Plos One**, v. 8, 2013.

GUTIERREZ, F. et al. Effector mechanisms of macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. In: DENKERS, E.; GAZZINELLI, R. **Protozoans in macrophages**. Landes bioscience, 2007. cap. 16.

HOTEZ, P. et al. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 373, p. 1570-1575, 2009.

JOLLER, N.; WEBER, S.; OXENIUS, A. Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracelllular pathogens. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, p. 889-897, 2011.

JOSHI, T.; BUTCHAR, J.; TRIDANDAPANI, S. Fcgamma receptor signaling in phagocytes. **Int. J. Hematol**, v. 84, n. 3, p. 210-216, 2006.

JUNQUEIRA, C. et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 12, e. 29, 2010.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.**, v. 12, p. 511-517, 2010.

KIPNIS, T. L. et al. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, n. 1, p. 602-605, 1981.

KLIMOVICH, V. IgM an its receptors: structural and functional aspects. **Biochemistry (Mosc)**, v. 76, n. 5, p. 654-672, 2011.

KRETTLI, A.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.**, v. 116, n. 3, p. 755-760, 1976.

LIMA, F. et al. The challenge of Chagas' disease: Has the humam pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells?. **N. Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 837-842, 2010.

MACHADO, F. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Semin. Immunopathol.**, v. 34, n. 6, p. 753-770, 2012.

MARINHO, C. et al. Influence of acute-phase parasite load on phatology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 1, p. 308-318, 1999.

MARINHO, C. et al. 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.**, v. 66, n. 2-3, p. 297-308, 2007.

MARINHO, C. et al. Infection by the Sylvio X10/4 clone of *Trypanosoma cruzi*: relevance of a low-virulence model of Chagas' disease. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 13, p. 1037-1045, 2009.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, v. 64, n. 3, p. 475-482, 1978.

MELO, R. C.; MACHADO, C. R. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. **Exp. Parasitol.**, v. 97, n. 1, p. 15-23, 2001.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009.

MOSSER, D.; EDWARDS, J. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 958-970, 2008.

MURRAY, P.; WYNN, T. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cell. Microbiol.**, v. 14, n. 5, p. 634-643, 2012.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Vet. Res.**, v. 40, n. 2, p. 26-40, 2009.

NORRIS, K. A.; BRADT, B.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J. Immunology**, v. 147, p. 2240-2247, 1991.

OSORIO, L. et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes Infect.**, v. 14, n. 15, p. 1390-1402, 2012.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARCONDES, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

ROMANO, P. et al. Molecular and cellular mechanism involved in the *Trypanosoma cruzi*/host cell interplay. **I.U.B.M.B. Life**, v. 64, p. 387-396, 2012.

SARDINHA, L. et al. The liver plays a major role in clearance and destruction of blood trypomastigotes in *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 1, 2010.

SHIBUYA, A. et al. Fcα/μ receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. **Nat. Immunol.**, v. 1, pp. 441-446, 2000.

SILVA, G. K. et al. Cutting edge: Nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 184, p. 1148-1152, 2010.

SMITH, L.; MAY, R. Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 41, n. 2, p. 475-490, 2013.

SWANSON, J.; HOPPE, A. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, p. 1093-1103, 2001.

TAMBOURGI, D. V. et al. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3656-3663, 1993.

TARLETON, R. L. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 430-434, 2007.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, pp. 179-190, 2007.

UMEKITA, L.; MOTA, I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 3, p. 253-258, 2000.

UMEKITA, L.; RAMOS, D.; MOTA, I. Clearance-inducing antibodies are responsible for protection against the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 10, p. 1191-1197, 1997.

UMEKITA, L. et al. Biological activity of chronic phase antibodies eluted from sensitized *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Immunol. Lett.**, v. 70, n. 2, p. 73-76, 1999.

UMEKITA, L.; TAKEHARA, H.; MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.**, v. 17, p. 85-89, 1988.

UNDERHILL, D.; GOODRIDGE, H. Information processing during phagocytosis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 7, p. 492-502, 2012.

VALCK, C. et al. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. **Mol. Immunol.**, v. 47, p. 1516-1521, 2010.

VAN ROOIJEN, N.; VAN KESTEREN-HENDRIKX, E. Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutic. **J. Liposome Res.**, v. 12, n. 1-2, p. 81-94, 2002.

VENTURINI, G. et al. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Biophys. Res. Commum.**, v. 270, n. 2, p. 437-441, 2000.

VIEIRA, M. et al. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 118, n. 6, p. 491-499, 2012.

ZAUNER, G. ET AL. Glycoproteomic analysis of antibodies. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 12, n. 4, p. 856-865, 2013.

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