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

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.

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.

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.