

**Giovana Giacomini**

**A infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio  
X10/4: envolvimento do sistema imune no controle da  
parasitemia**

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 corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo  
2012

## RESUMO

GIACOMINI, G. **A infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio X10/4: envolvimento do sistema imune no controle da parasitemia.** 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da doença de Chagas, exibe ampla heterogeneidade e inclui isolados virulentos e de baixa virulência que somente apresentam parasitemia patente em camundongos imunodeficientes. Poucos estudos analisaram a infecção *in vivo* com parasitas *T. cruzi* de baixa virulência, apesar de estes poderem representar uma grande parte dos casos em humanos. Aqui nós exploramos o envolvimento do sistema imune nos baixos níveis de parasitemia de camundongos infectados com parasitas de baixa virulência Sylvio X10/4. Camundongos C57Bl/6 (WT) inoculados intravenosamente (i.v.) com parasitas Sylvio X10/4 de cultura celular não apresentam parasitemia patente depois de 24 horas e as curvas de saída do sangue destes parasitas são similares àquelas dos parasitas de cultura celular da cepa Y (um isolado de alta virulência). Por outro lado, se os tripomastigotas inoculados foram isolados de camundongos imunodeficientes (SCID ou RAG2KO) infectados, nós observamos que os parasitas Y saem da corrente sanguínea mais lentamente do que os parasitas Sylvio X10/4. A análise da carga parasitária em diferentes órgãos 24 horas após a inoculação i.v. dos parasitas revelou que, apesar do conhecido miotropismo do Sylvio X10/4, a maioria dos parasitas injetados vão para o fígado e baço, assim como na infecção pela cepa Y, sugerindo um processo de remoção ativa. O envolvimento dos anticorpos naturais na saída do Sylvio X10/4 foi descartado pela comparação das curvas de parasitemia em camundongos WT ou SCID (que não possuem anticorpos). Uma pequena participação do sistema complemento foi sugerida analisando a parasitemia com Sylvio X10/4 em camundongos WT depletados de C3 pelo tratamento com *Cobra Venom Factor* (CVF). Nossas observações que camundongos IFN- $\gamma$ KO infectados com Sylvio X10/4 apresentaram parasitemia intermitente nas primeiras semanas da infecção não podem ser atribuídas à deficiência na produção de proteínas de fase aguda, na medida em que nestes camundongos foram encontrados altos níveis de amiloide A sérica e amiloide P sérica. Enquanto a infecção pelo parasita Sylvio X10/4 progride, anticorpos parasita-específicos se tornam cruciais para o controle do parasita, uma vez que camundongos BKO infectados sucumbem à infecção em 2-3 meses. Além disso, um papel protetor foi sugerido para a IgM parasita-específica uma vez que animais CD28KO, que não produzem IgG específica, são mais resistentes à infecção por Sylvio X10/4 do que o BKO; além disso, as proteínas de fase aguda não parecem estar relacionadas às imunodeficiências destes animais. Assim, sugerimos que a rápida saída que segue a inoculação i.v. do Sylvio X10/4 é um processo de remoção ativa. Em longo prazo, não somente a IgG, mas anticorpos parasita-específicos IgM tem um papel importante na proteção.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Parasitemia. Anticorpos. IFN- $\gamma$ . Proteínas de fase aguda.

## ABSTRACT

GIACOMINI, G. **The murine infection by *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio X10/4: immune system involvement in parasitemia control.** 2012. 75 p. Masters thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

*Trypanosoma cruzi*, the parasite responsible for Chagas' disease, displays wide heterogeneity and includes virulent isolates and low-virulence ones which only yield patent parasitemias in immunodeficient mice. Few studies analyzed the *in vivo* infection with low virulence *T. cruzi* parasites in spite these may account for a large portion of human cases. Here we explored the involvement of the immune system in the low level parasitemia of mice infected with low-virulence Sylvio X10/4 parasites. C57BL/6 (WT) mice inoculated intravenously (i.v.) with tissue culture Sylvio X10/4 parasites do not show patent parasitemias after 24 hours and the blood clearance curves of these parasites being similar to those of tissue culture Y strain parasites (a high-virulence isolate). Meanwhile, if the inoculated trypomastigotes were isolated from immunodeficient infected mice (SCID or RAG2KO) we observed that Y parasites leave the bloodstream more slowly than Sylvio X10/4 parasites do. Analysis of parasite loads at different organs 24 hours after i.v. parasite inoculation revealed that, in spite of the known myotropism of Sylvio x10/4, most injected parasites go to the liver and spleen, as well as infection with Y strain, suggesting an active removal process. The involvement of natural antibodies in Sylvio X10/4 removal was discarded by comparing the blood clearance curves in wild-type or SCID mice (which lack antibodies). A small participation of the complement system was suggested by analyzing Sylvio X10/4 parasitemia in WT mice depleted of C3 by cobra venom factor (CVF) treatment. Our observation that Sylvio X10/4-infected IFN- $\gamma$ KO mice showed intermittent patent parasitemias in the first weeks of infection can not be attributed to deficiency in the production of acute phase proteins, in as much as these mice were found to secrete high levels of serum amyloid A and serum amyloid P. As infection by Sylvio X10/4 parasites progressed, parasite-specific antibodies became crucial for parasite control, given that infected BKO mice succumbed to infection in 2-3 months. In addition, a protective role was suggested for parasite-specific IgM since CD28KO mice, which do not produce specific IgG, are more resistant than BKO to infection by Sylvio X10/4; moreover, the acute phase proteins do not appear to be related to immunodeficiency of these animals. Thus, we suggest that the rapid clearance that follows Sylvio X10/4 i.v. inoculation is an active removal process. At the long run, not only IgG, but also IgM parasite-specific antibodies play an important role in protection.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*. Chagas' disease. Parasitemia. Antibodies. IFN- $\gamma$ . Acute phase proteins.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas – aspectos gerais

A doença de Chagas, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, foi descrita em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (ANIS; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Constitui um problema de saúde pública, uma vez que acomete cerca de 10 milhões de pessoas no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012), principalmente na América Latina onde a doença é endêmica (**Fig. 1**) e resulta em 14.000 mortes a cada ano (HOTEZ et al., 2009).

**Figura 1** - Distribuição dos casos de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

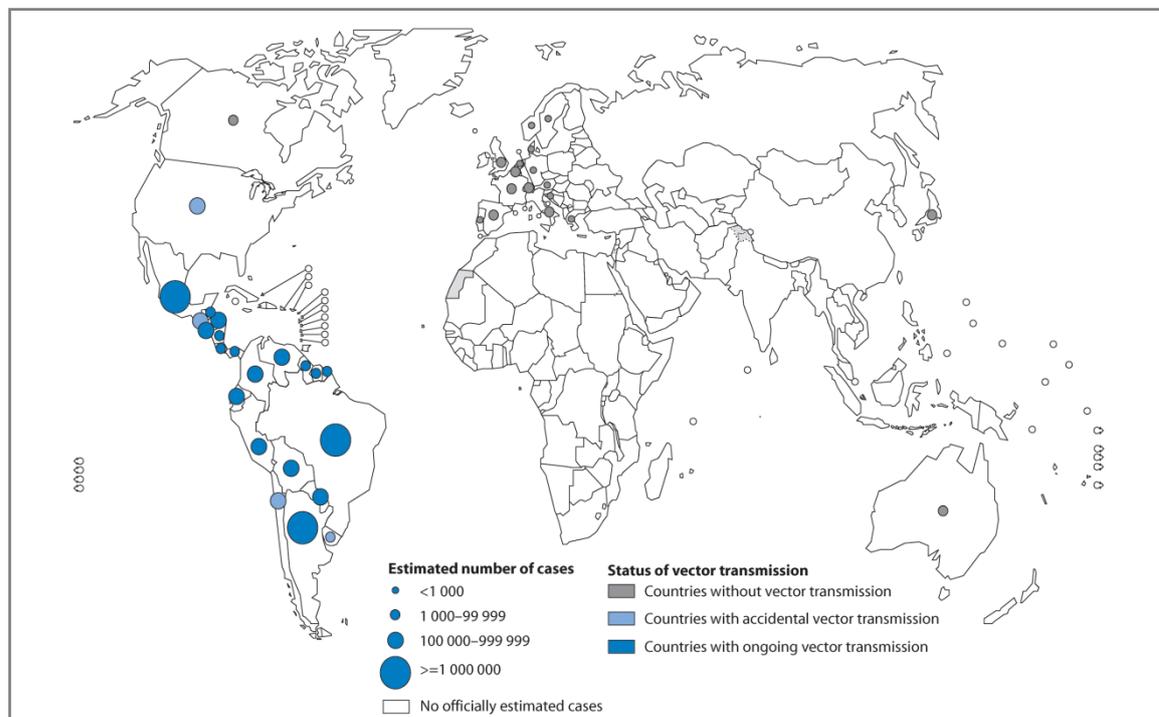


Ilustração mostrando a distribuição dos casos de infecção pelo *T. cruzi* baseado em estimativas oficiais, e status da transmissão vetorial, no mundo, entre 2006 e 2009.

Fonte: Modificado de (WHO, 2005).

O ciclo doméstico de transmissão do *T. cruzi* inicia-se quando as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes presente nas fezes do vetor triatomíneo penetram, através da pele lesada ou mucosa, em diferentes tipos celulares do hospedeiro, se transformando na forma amastigota (JUNQUEIRA et al., 2010). As formas intracelulares amastigotas se multiplicam por fissão binária, se diferenciam em formas tripomastigotas e, após romperem a célula infectada, infectam células

adjacentes e caem na corrente sanguínea para então invadir tecidos distantes (BRENER, 1973). A transmissão também pode ocorrer por transfusão sanguínea, via transplacentária, via oral, aleitamento materno, acidentes laboratoriais e transplante de órgãos (MACHADO et al., 2009). Políticas de prevenção eficazes à doença de Chagas poderiam envolver o controle eficaz do vetor nas áreas endêmicas; a triagem rigorosa nos bancos de sangue e de possíveis doadores de órgãos e a identificação e tratamento precoce de recém-infectados e de casos ainda na fase assintomática (BIOLO; RIBEIRO; CLAUSSEL, 2010).

A doença de Chagas apresenta três fases clínicas. A fase aguda se caracteriza por parasitemia patente e presença de grande número de ninhos de amastigotas em diversos tecidos; com o estabelecimento de uma resposta imunológica que minimiza a proliferação e disseminação do protozoário, 70-80% das pessoas infectadas permanece assintomática, característica da fase indeterminada. Por fim, os 20-30% restantes desenvolvem as formas cardíaca ou digestiva, ou raramente ambas, da fase crônica da doença, com cardiomiopatia e/ou arritmias que podem levar a insuficiência cardíaca congestiva e megassíndromes digestivas do esôfago ou cólon (MARINHO et al., 2004). Contudo, é importante destacar que em um grande número de casos a fase aguda permanece despercebida, seja pela ausência de sintomas ou por estes serem confundidos com os de um quadro febril comum (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2012).

## **1.2 Manifestações clínicas na doença de Chagas**

A cardiomiopatia crônica é a principal manifestação na doença de Chagas com infiltrados de células mononucleares no miocárdio, endocárdio e pericárdio, ninhos de amastigotas e fibrose (MARINHO et al., 2009). Algumas manifestações clínicas envolvem insuficiência cardíaca, arritmias, tromboembolismo, derrame e morte repentina (BIOLO; RIBEIRO; CLAUSELL, 2010). Já a forma digestiva apresenta manifestações como dilatação do trato gastrointestinal e desordens motoras, que se acredita resultem de danos ao sistema nervoso entérico (MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009).

Até pouco tempo atrás, a miocardiopatia chagásica era considerada como uma doença parasitária na fase aguda da infecção, com inflamação induzida pela

presença do parasita, e como uma doença autoimune na fase crônica (CUNHA-NETO et al., 1995); no entanto, a miocardiopatia crônica é hoje contemplada como o resultado de uma interação multifatorial, persistente e variável entre o parasita e seu hospedeiro (LESCURE et al., 2010). Assim, apesar da escassez de parasitas nas lesões cardíacas (o maior argumento da hipótese autoimune), muitas evidências sugerem que a presença do parasita no coração é que promove o processo de inflamação crônica, com fibrose e perda de células miocárdicas (MARINHO et al., 2009).

### **1.3 A heterogeneidade do *Trypanosoma cruzi***

O *T. cruzi* é dotado de uma ampla heterogeneidade. Na Segunda Reunião Satélite da XXXVI Reunião Anual em Pesquisa Básica sobre a Doença de Chagas (Búzios, RJ, agosto de 2009) ficou definido (com base nos conhecimentos atuais) que os isolados de *T. cruzi* podem ser agrupados em 6 conjuntos (DTUs), denominados *T. cruzi* I-VI (ZINGALES et al., 2009). Alguns destes grupos genéticos mostram associação discreta com os ciclos doméstico ou silvestre de transmissão, com a distribuição geográfica do parasita no continente americano e com o desenvolvimento dos diferentes quadros patológicos da doença (BHATTACHARYYA et al., 2010). Ainda em relação à heterogeneidade do parasita, diferentes classificações baseadas na morfologia das formas tripomastigotas, na taxa de mortalidade, na parasitemia induzida na infecção experimental e no tropismo foram descritos. Em relação a este último ponto, as cepas são agrupadas em cepas miotrópicas, que invadem preferencialmente células musculares estriadas, ou reticulotrópicas, que invadem preferencialmente macrófagos (BRENER, 1973).

Devido à dificuldade em trabalhar com a doença em humanos, grande parte da nossa compreensão sobre os fenômenos imunológicos envolvidos na infecção pelo *T. cruzi* foi estabelecida em modelos experimentais murinos. Nestes modelos, os isolados de *T. cruzi* variam desde aqueles que determinam altas parasitemias e levam frequentemente à morte do hospedeiro na fase aguda (MARINHO et al., 1999) até outros que resultam em parasitemias subpatentes (reveladas unicamente por ensaios de amplificação) e promovem baixa ou nenhuma mortalidade em camundongos normais (MARINHO et al., 2007). Ignorando esta heterogeneidade, os

estudos de caracterização da resposta imune em camundongos utilizaram, quase que exclusivamente, parasitas de alta virulência.

O estudo da infecção com parasitas de baixa virulência permite uma visão mais aprofundada, uma vez que possibilita valiosas informações sobre a resposta imune ao *T. cruzi* que passam despercebidas nas infecções por parasitas mais virulentos (MARINHO et al., 2009). No nosso laboratório temos estudado a infecção pelo parasita de baixa virulência Sylvio X10/4, um clone miotrópico de *T. cruzi* tipo I isolado por Miles (MILES, 1974) a partir de parasitas da cepa Sylvio X10 retirados de um inseto *Rhodnius prolixus* que foi utilizado no xenodiagnóstico de um paciente do Pará com infecção aguda (SILVEIRA et al., 1979). Este *T. cruzi* promove uma infecção sem parasitemia patente em camundongos normais, e no camundongo C3H/HePAS determina um quadro de miocardite crônica que apresenta grandes similaridades com o quadro da miocardiopatia chagásica crônica em humanos (MARINHO et al., 2009).

A diversidade do *T. cruzi* não é, entretanto, o único elemento a ser considerado no desenvolvimento dos diferentes quadros patológicos e evolução da infecção, uma vez que, fatores genéticos do hospedeiro também influenciam na suscetibilidade à infecção (POSTAN, 1987). Além disso, estudos com animais mostraram que há uma relação entre a carga parasitária durante a fase aguda da infecção e a parasitemia, patologia e resposta imune na fase crônica da doença (MARINHO et al., 1999).

#### **1.4 A resposta imune murina ao *T. cruzi***

O sistema imune parece estar envolvido nos três principais aspectos da doença de Chagas: i) no controle da replicação do parasita; ii) na sua propagação, e iii) na reação inflamatória nos tecidos infectados (considerada a grande causa de dano tecidual e, conseqüentemente, de disfunção dos órgãos) (JUNQUEIRA et al., 2010).

Algumas células efetoras do sistema imune, como as células dendríticas, macrófagos e células NK (*natural killer*), são importantes no controle inicial da replicação do parasita devido à produção de citocinas, como a IL-12 (Interleucina-12), TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) e IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), além de moléculas

efetoras como intermediários reativos de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Intermediates*, RNI) e oxigênio (*Reactive Oxygen Intermediates*, ROI) (JUNQUEIRA et al., 2010).

As células dendríticas e os macrófagos reconhecem componentes moleculares do *T. cruzi* e orquestram a resposta imunológica. O reconhecimento do parasita se dá por receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR), o que determina a produção de citocinas pró-inflamatórias (JUNQUEIRA et al., 2010). Além disso, por se tratar de um parasita intracelular, o reconhecimento do *T. cruzi* também ocorre por membros da família de receptores do tipo Nod (*Nod-like receptors*, NLR), especialmente Nod1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain 1*), e a cascata que se desenvolve após este reconhecimento culmina com a produção de uma série de citocinas e quimiocinas (SILVA et al., 2010).

Os macrófagos possuem dois papéis distintos na infecção pelo *T. cruzi*: como célula hospedeira do parasita e como célula efetora na resposta imune. O diferente papel que esta célula vai executar depende do seu estado de ativação no momento da interação com o parasita (GOLDEN; TARLETON, 1991). Ativadas por várias citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ , a ação citotóxica destas células na erradicação do parasita intracelular se dá principalmente pela ação do óxido nítrico (*Nitric Oxide*, NO) (KAYAMA; TAKEHARA, 2010) e radicais de oxigênio. Outra população que também possui papel importante na resistência à infecção aguda ao *T. cruzi* é a célula NK, principalmente devido sua produção inicial de IFN- $\gamma$  (ANTÚNEZ; CARDONI, 2000). Estudos apontam que animais ausentes de células NK, ou que as apresentam em menor número, desenvolvem altas parasitemias e altas taxas de mortalidade (ROTTENBERG et al., 1988).

As células dendríticas fazem a ligação da resposta imune inata com a resposta imune adquirida pela apresentação de antígenos do parasita e da produção de IL-12 para a diferenciação de células T *helper* 1 (Th1) CD4<sup>+</sup> e ativação das células NK (JUNQUEIRA et al., 2010). As células Th1 atuam na infecção pelo seu papel auxiliar na resposta humoral e pela ativação de macrófagos e células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas por meio da produção de IFN- $\gamma$ . Enquanto a citotoxicidade das células T CD8<sup>+</sup> destrói as células contendo amastigotas, os anticorpos produzidos pelos plasmócitos auxiliam na fagocitose das formas tripomastigotas opsonizadas com IgG (JUNQUEIRA et al., 2010) (**Fig. 2**).

O IFN- $\gamma$ , considerado a molécula chave no controle do *T. cruzi*, está envolvido em vários aspectos da infecção e seu efeito protetor reflete uma combinação de várias atividades efetoras como a indução de óxido nítrico e outras moléculas efetoras dos macrófagos, aumento da expressão de MHC de classe II, polarização Th1 das células T CD4<sup>+</sup>, mudança de subclasse de anticorpos para IgG2a e produção de quimiocinas (MARINHO et al., 2007).

**Figura 2** - Resposta imune na infecção com *Trypanosoma cruzi*

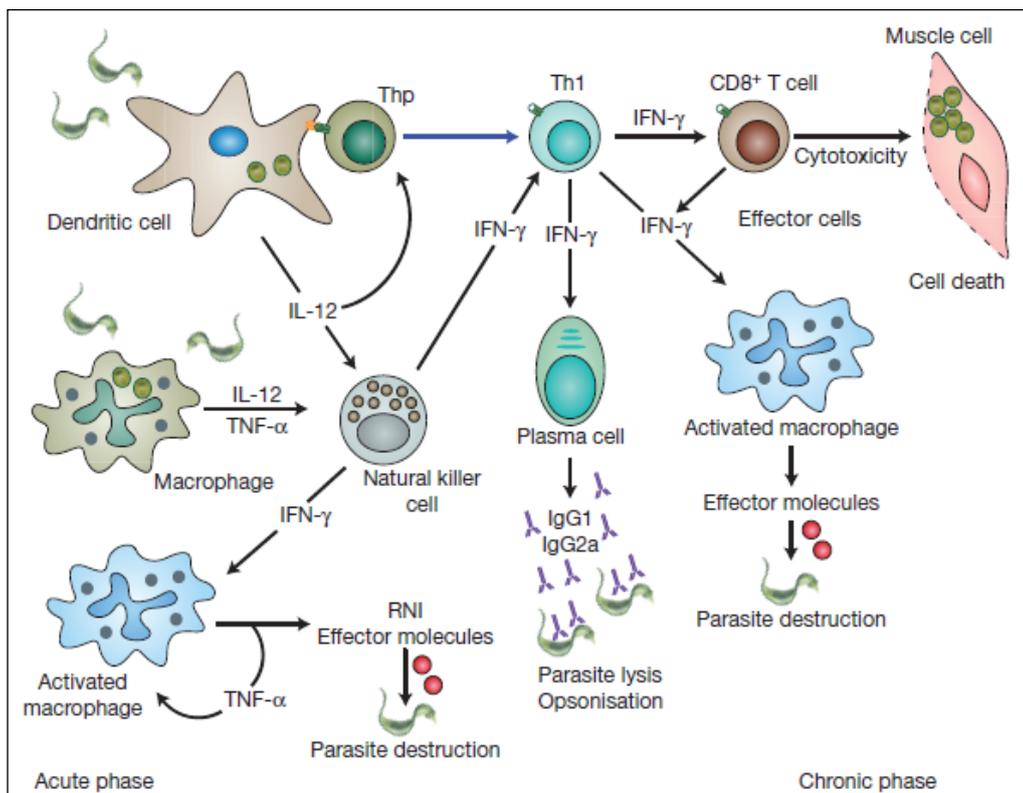


Ilustração da resposta imune inata e adquirida desencadeada pela infecção pelo *T. cruzi*.  
Fonte: Junqueira, et al. (2010).

### 1.5 O controle do *T. cruzi* no sangue

Na resposta efetora ao *Trypanosoma cruzi* há o envolvimento de muitas moléculas solúveis (anticorpos, componentes do sistema complemento, citocinas, dentre outras) e diversos tipos celulares, como fagócitos e linfócitos (MARINHO et al., 1999).

Já a partir das primeiras semanas de infecção, os anticorpos específicos das classes IgM e IgG, colaborando com macrófagos e neutrófilos, contribuem para a

remoção do *T. cruzi* do sangue e do tecido, atuando principalmente pela opsonização do parasita (MARINHO et al., 1999). Os anticorpos parasita-específicos representam uma das mais potentes opsoninas já descritas, promovendo a fagocitose e citotoxicidade nos macrófagos, neutrófilos e células NK (JOSHI; BUTCHAR; TRIDANDAPANI, 2006). Tanto para o clone Sylvio X10/4 como para outras cepas de *T. cruzi* a resposta de anticorpos em camundongos é dominada pelo isotipo IgG2a, em concordância com o perfil predominantemente Th1 da resposta anti-*T. cruzi* (MARINHO et al., 2009).

O sistema complemento também participa na defesa frente ao *T. cruzi*. Assim, já foi mostrado que os anticorpos específicos das classes IgG e IgM, produzidos ao longo da infecção contra os epítomos do parasita, ativam o complemento *in vitro* (pelas vias clássica e alternativa) (KIPNIS et al., 1992). Mais ainda, animais inoculados com CVF (*Cobra Venom Factor*), que consome o componente C3, apresentam aumento da parasitemia e mortalidade (BUDZKO; PIZZIMENTI; KIERSZENBAUM, 1975). A proteção conferida pelo complemento parece operar em conjunto com os anticorpos específicos da classe IgG, promovendo a opsonização do parasita (UMEKITA; RAMOS; MOTA, 1997). Isto foi demonstrado em animais transferidos com soro de fase crônica, nos quais a remoção das formas tripomastigotas no sangue por células do sistema fagocítico mononuclear foi totalmente abolida após o tratamento com CVF (MOTA; UMEKITA, 1989).

Na ausência de anticorpos, entretanto, já foi descrito que glicoproteínas na superfície do parasita interferem na formação da C3 convertase da via clássica e alternativa (TAMBOURGI et al., 1995), ou na formação e/ou inserção do complexo de ataque à membrana (*Membrane Attack Complex*, MAC) (KIPNIS et al., 1992). Contudo, não há informações se o sistema complemento possui algum papel na remoção do *T. cruzi* no início da infecção. Sugestivo desta possibilidade, Cestari e Ramirez (2010) recentemente demonstraram, utilizando soro normal humano não imune, que o sistema complemento pode reconhecer *in vitro* formas tripomastigotas metacíclicas de diversas linhagens do *Trypanosoma cruzi*. Estes autores mostraram que a ativação de complemento pelas formas metacíclicas ocorre pela via das lectinas e via alternativa, enquanto a via clássica tem um envolvimento limitado (o que pela sua vez sugere a não participação dos anticorpos naturais no reconhecimento do *T. cruzi*).

Desconhecemos se outras moléculas solúveis, além dos anticorpos e complemento, participam na remoção do *T. cruzi* no sangue ou tecidos. Em humanos e camundongos, a resposta imune inata a microorganismos abrange uma variedade de respostas celulares e humorais que inclui a produção de proteínas de fase aguda, moléculas sintetizadas pelos hepatócitos após sinalização por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; STADNYK; GAULDIE, 1991). Dentre estas, a proteína C reativa (*C-Reactive Protein*, CRP) e a amiloide P sérica (*Serum Amyloid P*, SAP), sua forma análoga em camundongos, são elementos que participam na remoção de alguns microorganismos, seja por ação opsonizante direta, ou indiretamente por meio da ativação do sistema complemento pela via clássica (STEEL; WHITEHEAD, 1994). Já a ação da amiloide A sérica (*Serum Amyloid A*, SAA) ainda não está completamente esclarecida, mas algumas funções têm sido descritas e envolvem a modulação da resposta anti e pró-inflamatória (URIELI-SHOVAL; LINKE; MATZNER, 2000). Outra proteína de fase aguda que pode ativar a cascata do complemento, pela via das lectinas, é a lectina ligante de manose (*Mannose Binding Lectin*, MBL), uma proteína pertencente à família das colectinas que também é sintetizada no fígado, mas que pode ser produzida por macrófagos e outros leucócitos (OGDEN et al., 2001). Mais ainda, já foi descrito o envolvimento da MBL na opsonização de microorganismos e sua ausência relacionada à suscetibilidade a infecções, como sugerido na relação entre a deficiência de MBL e infecção por *Pseudomonas* em pacientes com fibrose cística (GABOLDE et al., 1999). A MBL se liga a açúcares na superfície dos microorganismos e interage com receptores para colectinas encontrados em vários tipos celulares, incluindo macrófagos (HANSEN et al., 2000). Até o momento não existem dados sobre o envolvimento destas proteínas de fase aguda na infecção pelo *T. cruzi*, assim como da eventual participação destas moléculas na remoção das formas tripomastigotas da corrente sanguínea e dos tecidos.

O entendimento dos mecanismos e/ou elementos envolvidos na saída do *T. cruzi* do sangue requer estudos adicionais. Neste trabalho temos abordado este assunto utilizando o modelo de infecção murina por parasitas Sylvio X10/4, um clone de *T. cruzi* de baixa virulência, escolha que oferece um elemento adicional de interesse. Apesar dos amplos conhecimentos existentes sobre a doença de Chagas,

desconhecemos qual a frequência de pacientes que apresentam parasitemia manifesta (visível ao microscópio) nas primeiras semanas de infecção e a frequência de pacientes que mostram parasitemia subpatente, ou seja, indetectável pelo exame direto do sangue no microscópio. Enquanto esta característica parece ser dependente do tipo de parasita infectante, desconhecemos a causa subjacente a ausência de parasitemia patente na infecção por diversos isolados. A princípio, duas possibilidades poderiam explicar este fato: a) uma capacidade invasiva exacerbada destes parasitas; e b) uma eficiente remoção dos parasitas do sangue propiciada por algum elemento humoral ou celular do hospedeiro. O estudo desta problemática constitui o objetivo central desta dissertação de mestrado, que foi abordado estudando a parasitemia logo após a inoculação em camundongos, pela via intravenosa, de um número elevado de parasitas Sylvio X10/4, um clone de *T. cruzi* que, como indicado acima, não induz parasitemia patente em camundongos com sistema imune normal.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho trazem contribuições para o entendimento das possíveis moléculas envolvidas na ausência de parasitemia em camundongos inoculados com o parasita do clone de baixa virulência Sylvio X10/4. Assim, as principais conclusões foram:

- animais inoculados via intravenosa por parasitas do clone de baixa virulência Sylvio X10/4 não apresentam parasitemia patente após 24 horas;
- nas condições experimentais utilizadas na manutenção do *T. cruzi in vitro*, parasitas isolados do 7º dia de cultura em células LLCMK2, quando inoculados em camundongos normais, geram níveis superiores de parasitemia que parasitas isolados do 9º dia de cultura;
- animais C57Bl/6 WT infectados com parasitas da cepa de alta virulência Y isolados de cultura de células LLCMK2, da mesma forma que o clone Sylvio X10/4, não apresentam parasitemia patente após 24 horas de infecção, com curvas de parasitemia semelhantes;
- *T. cruzi* da cepa Y isolados do sangue de animais imunodeficientes previamente infectados saem mais lentamente da corrente sanguínea;
- a ausência de parasitas do clone Sylvio X10/4 no sangue não pode ser explicada pelo seu miotropismo, uma vez que 24 horas após a inoculação via intravenosa os parasitas foram encontrados preferencialmente no fígado e no baço, indicando a possibilidade dos parasitas serem ativamente removidos;
- anticorpos naturais (IgM e IgG) não são essenciais para a saída do parasita do clone Sylvio X10/4 nas primeiras horas da infecção;
- o sistema complemento de animais recém-infectados i.v. poderia contribuir na saída das formas tripomastigotas do clone Sylvio X10/4 da corrente

sanguínea quando os parasitas são isolados do sangue de animais imunodeficientes, mas não quando os parasitas são obtidos de cultura *in vitro*;

- a ausência da citocina IFN- $\gamma$  leva a uma parasitemia intermitente, a qual não é devida a deficiência de proteínas de fase aguda;
- animais deficientes em linfócitos B são altamente susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* clone Sylvio X10/4;
- animais C57Bl/6 CD28KO são mais resistentes à infecção pelo *T. cruzi* clone Sylvio X10/4 do que os animais C57Bl/6 BKO. Este resultado sugere que, a médio/longo prazo, o anticorpo específico IgM tem efeito protetor na infecção por parasitas do clone Sylvio X10/4;
- apesar da ausência de parasitemia patente e parasitemias subpatentes muito parecidas nos animais C57Bl/6 BKO e C57Bl/6 CD28KO, os perfis semelhantes encontrados na produção das proteínas de fase aguda não parecem estar relacionados às imunodeficiências destas duas linhagens.

## REFERÊNCIAS\*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade Inata. In:\_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 55-88.
- ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Med. Bahia**, v. 70, p. 32-42, 1970.
- ANIS, R. J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.
- ANTÚNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN- $\gamma$  production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunol. Lett.**, v. 71, n. 2, p. 103-109, 2000.
- ARAI, T.; TABONA, P.; SUMMERFIELD, J. A. Human mannose-binding protein gene is regulated by interleukins, dexamethasone and heat shock. **QJM: Int. J. Med.**, v. 86, n. 9, p. 575-582, 1993.
- BIOLO, A.; RIBEIRO, A. L.; CLAUSSEL, N. Chagas cardiomyopathy – where do we stand after a hundred years? **Prog. Cardiovasc. Dis.**, v. 52, n. 4, p. 300-316, 2010.
- BOSMA, M. J.; CARROLL, A. M. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 323-350, 1991.
- BRATTACHARYYA, T. et al. Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. **Int. J. Parasitol.**, v. 40, n. 8, p. 921-928, 2010.
- BRENER, Z. Biology of trypanosome cruzi. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 347-382, 1973.
- BRODSKYN, C. I. et al. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 67, n. 6, p. 343-348, 1989.
- BUDZKO, D. B.; PIZZIMENTI, M. C.; KIERSZENBAUM, F. Effects of complement depletion in experimental chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 11, n. 1, p. 86-91, 1975.

\*De acordo com:

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

CESTARI, I.; RAMIREZ, M. I. Inefficient complement system clearance of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enables resistant strains to invade eukaryotic cells. **Plos One**, v. 5, n. 3, p. 1-11, 2010.

CONTRERAS, V. T. et al. *Trypanosoma cruzi*: Metacyclogenesis in vitro: I. changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 2, p. 253-259, 1994.

CRAY, C.; ZAIAS, J; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. **Comp. Med.**, v. 59, n. 6, p. 517-526, 2009.

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, n. 8, p. 3541-3545, 1995.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as makers of disease in animals. **Revue Méd. Vét.**, v. 151, n. 7, p. 577-584, 2000.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Doença de Chagas**. 2012. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>>. Acesso em: 9 nov. 2012.

GABOLDE, M. et al. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study. **Brit. M. J.**, v. 319, p. 1166-1167, 1999.

GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp. Parasitol.**, v. 72, n. 4, p. 391-402, 1991.

HANSEN, S. et al. Purification and characterization of two mannan-binding lectins from mouse serum. **J. Immunol.**, v. 164, n. 5, p. 2610-2618, 2000.

HOTEZ, P. J. et al. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 373, n. 9674, p. 1570-1575, 2009.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collectins and ficolins: humoral lectins of innate immune defense. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 547-578, 2003.

JOSHI, T.; BUTCHAR, J. P.; TRIDANDAPANI, S. Fc $\gamma$  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. **Exp. Rev. Mol. Med.**, v. 12, n. 29, p. 1-23, 2010.

KAHN, S. et al. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. 5, p. 1243-1258, 1995.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microb. Infect.**, v. 12, n. 7, p. 511-517, 2010.

KIPNIS, T. L. et al. Comparison of the C-mediated killing activity and C-activating properties of mouse monoclonal and polyclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi*. **Mediators Inflamm.**, v. 1, p. 309-312, 1992.

KITAMURA, D. et al. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. **Nature**, v. 350, n. 6317, p. 423-426, 1991.

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

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8<sup>+</sup> T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Paras. Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 207-216, 1998.

LESCURE, F. X. et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect. Dis.**, v. 10, n. 8, p. 556-570, 2010.

LOPES, E. S. G.; PRADO JÚNIOR, J. C. A influência da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* no coração em ratos wistar machos submetidos ao processo de adrenalectomia. **Biodiversidade**, v. 6, n. 1, p. 62-76, 2007.

MACHADO, C. M. et al. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, n. 6, p. 309-324, 2009.

MALLE, E.; STEINMETZ, A.; RAYNES, J. G. Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. **Atheroscler. Suppl.**, v. 102, n. 2, p. 131-146, 1993.

MARINHO, C. R. F. et al. Influence of acute phase parasite load on pathology, 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. R. F. et al. Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a *Trypanosoma cruzi* clone: a model for genetic studies in Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 4, p. 2350-2357, 2004.

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

MARTINS, G. A. et al. CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microb. Infect.**, v. 6, n. 13, p. 1133-1144, 2004.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

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

MILES, M. A. Cloning *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 3, p. 256, 1974.

MOTA, I.; UMEKITA, L. F. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. **Immunol. Lett.**, v. 21, n. 3, p. 223-225, 1989.

OGDEN, C. A. et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 6, p. 781-795, 2001.

PEREIRA, M. E. et al. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 9, p. 3884-3892, 1996.

POSTAN, M.; DVORAK, J. A.; McDANIEL, J. P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN<sup>-</sup> mice with two clones isolated from a common source. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 3, p. 497-506, 1983.

RODRIGUES, A. A. et al. IFN- $\gamma$  plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **Plos. Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 4, p. 1-9, 2012.

ROSENBERG, A. I. et al. Differential expression on *Trypanosoma cruzi* neuraminidase in intra- and extracellular trypomastigotes. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 464-466, 1991.

ROTTENBERG, M. et al. Role of T Helper/Inducer cells as well as Natural Killer Cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.**, v. 28, n. 5, p. 573-582, 1988.

SARDINHA, L. R. 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, p. 1-9, 2010.

SCHARFSTEIN, J.; BARCINSKI, M. A.; LEON, L. L. Induction of the acute-phase protein serum amyloid P in experimental Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 1, p. 46-51, 1982.

SCHRODER, K. et al. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

SHISHIDO, S. N. et al. Humoral innate immune response and disease. **Clin. Immunol.**, v. 144, n. 2, p. 142-158, 2012.

SILVA, A. M. M. et al. Differences in the antigenic profile of bloodstream and cell culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 31, n. 3, p. 146-150, 1989.

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, n. 3, p. 1148-1152, 2010.

SILVEIRA, F. et al. Nono caso autóctone de doença de Chagas registrado no estado do Pará, Brasil. **Hileia Med.**, v. 1, p. 61-62, 1979.

STADNYK, A. W.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Trends. Immunol.**, v. 12, n. 3, p. 7-12, 1991.

STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol. Today**, v. 15, n. 2, p. 81-88, 1994.

TAKEHARA, H. A. et al. *Trypanosome cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp. Parasitol.**, v. 52, n. 1, p. 137-146, 1981.

TAMBOURGI, D. V. et al. Detection of *Trypanosoma*-decay accelerating factor antibodies in mice and humans infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 6, p. 516-520, 1995.

UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.**, v. 17, n. 1, p. 85-89, 1988.

UMEKITA, L. F.; RAMOS, D. P.; 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.

URIELI-SHOVAL, S.; LINKE, R. P.; MATZNER, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 7, n. 1, p. 64-69, 2000.

WHITEHEAD, A. S. et al. Mouse C-reactive protein. Generation of cDNA clones, structural analysis, and induction of mRNA during inflammation. **Biochem. J.**, v. 266, n. 1, p. 283-290, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Aug 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 5 abr. 2012.

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.