Marcela Hernández Torres

Papel de Bim na resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* durante a infecção experimental

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
2015

Marcela Hernández Torres

Papel de Bim na resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* durante a infecção experimental

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. João Gustavo P. Amarante-Mendes

Co-orientador: Prof. Dr. José Maria Alvarez Mosig

Versão original

São Paulo
2015

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

Torres, Marcela Hernández.
Papel de Bim na resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* durante a infecção experimental / Marcela Hernández Torres. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular do processo de apoptose.

Versão do título para o inglês: Role of Bim protein in the immune response to *Trypanosoma cruzi* during experimental infection.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Bim 3. Macrófagos 4. Linfócitos T CD8+ 5. Oxido nítrico 6. IFN-y I. Mendes, Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0175/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcela Hernández Torres.

Título da Dissertação: Papel de Bim na resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* durante a infecção experimental.

Orientador(a): Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

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: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **117** nas fls. **11** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **João Gustavo P.Amarante-Mendes,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel de BIM e PUMA na resposta imune ao trypanossoma cruzi durante a infecção experimental e em decorrência da vacinação com DNA plasmidial e adenovirus recombinante*" do qual participam o(s) aluno(s) **Marcela Hernández Torres,** 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 **14.10.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 14 de outubro de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Com profundo amor e gratidão a minha família por serem fonte da minha inspiração e a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. GRACIAS!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter colocado no meu caminho este país maravilhoso do qual me sinto muito agradecida. Agradeço pelas pessoas maravilhosas que conheci durante este tempo, pelas experiências vividas e pela aprendizagem que ficará para o resto da vida.

Á minha querida família por sempre serem a força de motivação para me tornar uma melhor pessoa e uma melhor profissional. Aos meus pais Luz Marina e Leopoldo e o meu irmão Christian por sempre acreditarem em mim e apoiar-me na realização dos meus sonhos. Porque apesar de estar a milhares de km sempre estiveram perto do meu coração. Aos meus tios e demais membros da minha família, em especial minha tia Nancy muito obrigada por sempre torcerem por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e a disposição diária para discutir os resultados. Obrigada também pela confiança e por ter acreditado em mim desde o começo.

À todos meus amigos e colegas do lab 244: Tiago, Sandy, Maria Emilia, Lu, Nath, Melanie, Barbara Saty, Pri Carvalho, Henry, Jennifer, Carol, Talita, Juninho, Ju, Eliza, Giulia, Danilulo, Pri Denapoli, Cris e Paola por cada um dos dias de trabalho que sempre foram mais alegres e divertidos na sua presença. Obrigada pela companhia na realização dos experimentos mesmo até de madrugada, pelas sugestões e os conselhos, pelas discussões de resultados, pelas inúmeras conversas e noites de pizza na copa, pelos momentos compartilhados fora do ambiente de trabalho e, em geral por terem se tornado parte da minha família. Vocês são simplesmente pessoas maravilhosas e pesquisadores incríveis e portanto desejo todo o sucesso do mundo nas suas carreiras e vidas pessoais.

À professora Jacqueline Jacysyn pela ajuda com a manipulação dos animais e a disposição sempre para me ajudar. Obrigada pelas viagens até o aeroporto e principalmente pela amizade e pelo grande carinho. Muito obrigada!!

À professora Karina Bortoluci pela contribuição na sugestão e discussão de experimentos para a finalização deste trabalho. Igualmente ao pessoal do seu laboratório, em especial a Kely, muito obrigada pela ajuda com os experimentos *in vitro* e pela amizade durante estes 2 anos de mestrado. Só desejo sucesso na sua vida, você merece.

Ao professor Jose Maria Mosig por ter aberto as portas do seu laboratório para realizar parte dos experimentos e ter contribuído na discussão dos resultados. Igualmente a todo o pessoal do seu laboratório, em especial ao Rogerio, o qual sou imensamente grata por todo o ensinamento obtido sobre a manipulação do parasita e o modelo de infecção. Muito obrigada pela paciência no início do meu mestrado, por sempre estar tão disposto a ajudar; agradeço também pela alegria e brincadeiras nas nossas conversas. Pessoas como você merecem todo o sucesso do mundo.

Ao professor Maurício Rodrigues, *in memoriam*, por ter disponibilizado seu laboratório e o material para a realização de alguns experimentos.

Aos professores da banca de qualificação, do PAE e das disciplinas que assisti durante este tempo, obrigada pelos ensinamentos e pela formação obtida. Sem dúvida hoje em dia sou uma melhor profissional graças a vocês.

Aos amigos do departamento de Imunologia Adri, Michele, Danny. Obrigada pelos momentos compartilhados e pelo apoio em diferentes momentos do meu mestrado. Desejo a vocês muito sucesso na suas carreiras, vocês merecem.

À todos os funcionários da portaria do ICB IV especialmente o Otacílio, Milton e Delman que estiveram durante estes 2 anos sempre com um sorriso no rosto e uma palavra amável para alegrar meu dia. Muito obrigada porque graças a vocês sempre tive um motivo para chegar feliz ao meu lugar de trabalho.

À Eni, João e aos demais funcionários do departamento pela paciência e pela ajuda com diferentes trâmites administrativos. Aos funcionários do biotério, especialmente Silvia e Marcio obrigada pela paciência e pela ajuda com a criação dos meus animais.

Aos amigos que se tornaram minha família no Brasil. Muito obrigada a Caroline, Fabi, Jenn e Sandra pela amizade de tantos anos, pelo apoio incondicional nos momentos de alegria e tristeza, pelas viagens e aventuras juntos, pelas inúmeras conversas filosóficas sobre o futuro das nossas vidas, pelos conselhos em momentos de dificuldade, pela paciência e em geral simplesmente pela alegria de saber que conto com pessoas tão maravilhosas como vocês. Espero que todos seus sonhos se realizem e continuem sendo as pessoas bem sucedidas que já são. Igualmente agradeço ao Philip e a Mariana pela amizade, a paciência e as conversas.

Às agências de fomento Fapesp e CNPq pelo suporte financeiro.

Finalmente... quero agradecer mais uma vez a todas as pessoas envolvidas diretamente ou indiretamente na realização deste trabalho. Sem dúvida alguma, este é o fruto do trabalho em equipe, do apoio incondicional e do carinho de cada uma das pessoas que me acompanharam durante esta fase da minha vida.

“Se enxerguei mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes.”

Isaac Newton

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos".

Isaac Newton

RESUMO

Hernández M. Papel de Bim na resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* durante a infecção experimental. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A proteína Bim é uma potente molécula pró-apoptótica da família Bcl-2 que participa na indução da via intrínseca ou mitocondrial de apoptose. Tem sido amplamente descrito na literatura o papel desta molécula no controle de diversos fenômenos do sistema imune como a seleção negativa de timócitos auto-reativos, a eliminação de linfócitos T ativados, a regulação de células T de memória e a eliminação de células B auto-reativas, entre outras funções. No que se refere ao controle de infecções, alguns trabalhos tem sugerido um papel negativo de Bim na persistência da infecção por patógenos como *Leishmania major*, *Mycobacterium tuberculosis* e o vírus da coriomeningite linfocítica. Não entanto, no modelo de infecção pelo *T. cruzi*, não há relatos na literatura sobre a função desta molécula no controle da replicação e eliminação do parasita. Dessa forma, neste trabalho nós investigamos o papel da proteína Bim no modelo de infecção murina pelo *T. cruzi e sua* importância na resposta imune dessa doença. Segundo os nossos resultados, após a imunização com $1x10^4$ formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi,* camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentaram um atraso no desenvolvimento da parasitemia seguida pela deficiência no controle do número de parasitas no sangue assim como uma diminuição da taxa de sobrevida quando comparado aos animais controles, sugerindo um papel importante desta molécula no controle da infecção pelo parasita. Após identificar a susceptibilidade de camundongos *Bim*$^{-/-}$ neste modelo experimental, nós verificamos os possíveis mecanismos imunológicos que estariam deficientes nestes animais. Inicialmente, nós identificamos uma diminuição da atividade microbicida de macrófagos da cavidade peritoneal, evidenciado pela deficiência na produção de oxido nítrico no pico da parasitemia. Esta deficiência mostrou ser independente da função efetora intrínseca destas células e pelo contrario poderia estar relacionada a uma diferença na composição das subpopulações de macrófagos nestes animais. De igual forma, foi obsevada uma diminuição da secreção de oxido nítrico e as citocinas pró-inflamatorias IFN-γ e IL-6, que em conjunto poderiam contribuir para o estabelecimento da alta carga parasitaria observada no dia 9 após a infecção. Nós também observamos que camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiência no desenvolvimento da resposta mediada por linfócitos T $CD8^+$ antígeno-específicos ao *T. cruzi* no pico da parasitemia (9º dia), sendo esta resposta rapidamente recuperada ao redor do dia 14-15 após a infecção. Em conjunto, nossos resultados sugerem um papel importante da proteína Bim no controle da infecção experimental pelo *T. cruzi* e desafia o entendimento da função desta molécula no controle de infecções.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi.* Bim. Macrófagos. Linfócitos T $CD8^+$. Óxido nítrico. IFN-γ.

ABSTRACT

Hernández M. Role of *Bim* protein in the immune response to *Trypanosoma cruzi* during experimental infection**.** [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Bim protein is a potent pro-apoptotic molecule of Bcl-2 family that participates in the induction of intrinsic or mitochondrial apoptosis pathway. It has been widely described in the literature the role of this molecule in the control of different phenomena of the immune system as negative selection of self-reactive thymocytes, activated T cells death, regulation of T memory cells and deletion of autoreactive B cells, among other functions. As regards control of infections, some studies have suggested a negative role of Bim, since promotes persistent infection of pathogens such as *Leishmania major*, *Mycobacterium tuberculosis* and lymphocytic choriomeningitis virus. However, in the *T. cruzi* infection model, there are no reports in the literature about the role of this molecule in the control of parasite replication. Therefore, we investigated the role of Bim protein in the murine infection model of *T. cruzi* and its importance in the immune response of this disease. According to our results, after immunization with $1x10^4$ trypomastigotes forms of the Y strain of *T. cruzi*, *Bim*$^{-/-}$ mice showed a delay in the development of parasitemia followed by a deficiency in the control of parasite load in the bloodstream and a decrease in the survival compared to the control animals, suggesting an important role of this molecule in the control of parasite infection. After identify the susceptibility of Bim$^{-/-}$ mice in this experimental model, we verify the possible immunological mechanisms that were deficient in these animals. Initially, we identified a decrease of the microbicidal activity of peritoneal macrophages, evidenced by a deficiency in nitric oxide production at the peak of parasitemia. This deficiency was independent of the intrinsic effector function of these cells and otherwise could be related to a difference in the composition of macrophages subsets in these animals. Similarly, we observed a decrease in nitric oxide and pro-inflammatory cytokines IFN-γ and IL-6 secretion which together may contribute to the establishment of high parasitic load observed at day 9 after infection. We also observed that Bim$^{-/-}$ mice have a deficiency in *T. cruzi* specific CD8$^+$ T lymphocytes response at the peak of parasitemia (9th day) and that this response is quickly recovered around day 14-15 after infection. Together, our results suggest an important role of Bim protein in the control of *T. cruzi* experimental infection and challenge our understanding of the function of this molecule in the control of different infections.

Keywords: *Trypanosoma cruzi.* Bim. Macrophages. CD8$^+$ T lymphocytes. Nitric oxide. IFN-γ.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração do ciclo de vida do *T. cruzi* 18

Figura 2 - Resposta imune na infecção pelo *T. cruzi* 22

Figura 3 - Proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 25

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para genotipagem de camundongos $Bim^{-/-}$ e Bim 34

Figura 5 - Estrategia de *gate* utilizada no ensaio de citotoxicidade *in vivo* 36

Figura 6 - Camundongos $Bim^{-/-}$ são susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* 43

Figura 7 - Curva de mortalidade em animais $Bim^{-/-}$ desafiados com *T. cruzi* 44

Figura 8 - Macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos $Bim^{-/-}$ são deficientes na produção de NO no pico da parasitemia 46

Figura 9 - Infecção in vitro de macrófagos peritoneais com *T. cruzi* 48

Figura 10 - A cavidade peritoneal de animais $Bim^{-/-}$ tem uma porcentagem reduzida da população SPM no pico da parasitemia 50

Figura 11 - Camundongos $Bim^{-/-}$ são deficientes na produção de NO, IFN-γ e IL-6 no pico da parasitemia 52

Figura 12 - Camundongos $Bim^{-/-}$ são deficientes na eliminação de células alvo pulsadas com o peptídeo PA8 no pico da parasitemia 54

Figura 13 - Ensaio de ELISPOT para determinar a frequência de células produtoras de IFN-γ no pico da parasitemia dos camundongos Bim 55

.

Figura 14 - Ensaio de citotoxicidade in vivo na fase de regressão da parasitemia 57

Figura 15 - Ensaio de ELISPOT para determinar a frequência de células produtoras de IFN-γ na fase de regressão da parasitemia 59

Figura 16 - Produção total dos anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a em animais $Bim^{+/+}$, $Bim^{+/-}$ e Bim 60

Figura 17 - Cinética da produção das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG2a específicas para o *T. cruzi* na fase aguda da infecção 61

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para genotipar camundongos $Bim^{+/-}$ e $Bim^{-/-}$.....33

Tabela II - Análise bacteriológica de camundongos $Bim^{-/-}$.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – células apresentadoras de antígeno

Apaf-1– *Apoptotic protease activating factor 1*

ASP-2 – proteína 2 de superfície de amastigotas

Bak – *Bcl-2 antagonist killer 1*

Bax –*Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2 protein family*

Bim – *Bcl-2 interacting Mediator of cell death*

DCs – células dendríticas

IAPs – *Inhibitors of apoptosis protein*

IFN-γ – Interferon-gama

i.p. – intraperitoneal

LCMV – vírus da coriomeningite linfocítica

LPM – *Large peritoneal macrophage*

MOMP – *mitochondrial outer membrane permeabilization*

NK – células natural killer

NLR – receptores de tipo NOD

NO – *Nitric oxide*

PRRs – receptores de reconhecimento de padrões

SFB – Soro Fetal Bovino

SPF – Specific-pathogen free

SPM – *Small peritoneal macrophage*

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

Th1 – Linfócitos T helper 1

TLR – receptores do tipo Toll

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

TS – trans-sialidases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**
1.1 Doença de Chagas **17**
1.1.2 Ciclo de vida do T. cruzi **17**
1.1.3 Dados clínicos da doença de Chagas **18**
1.1.4 Resposta imune à infecção experimental com Trypanosoma cruzi **19**
1.1.4.1 Resposta imune inata **19**
1.1.4.2 Resposta imune adaptativa **22**
1.2 Proteína Bim **25**
1.2.1 Ativação da proteína Bim **26**
1.2.2 Camundongos deficientes da proteína Bim **27**
1.2.3 Papel da proteína Bim nas infecções **28**
2 OBJETIVOS **29**
3 MATERIAIS E MÉTODOS **31**
3.1 Animais **32**
3.2 Manutenção dos camundongos *Bim*$^{-/-}$ **32**
3.3 Genotipagem de camundongos *Bim*$^{-/-}$ e *Bim*$^{+/-}$ **32**
3.4 Infecção e avaliação da parasitemia e mortalidade **34**
3.5 Ensaio de citotoxicidade *in vivo* **34**
3.5.1 Obtenção de esplenócitos **35**
3.5.2 Marcação, pulsação e transferência de esplenócitos **35**
3.5.3 Analise por citometria de fluxo **36**
3.6 ELISPOT **36**
3.7 Detecção das citocinas IFN-γ e IL-6 ..... **37**
3.8 Detecção de oxido nítrico **38**
3.9 Fenotipagem de macrófagos peritoneais **39**
3.10 Infecção in vitro de macrófagos peritoneais com *T. cruzi* **39**
3.10.1 Obtenção de macrófagos peritoneais **39**
3.10.2 Cultura de macrófagos e infecção in vitro com T. cruzi **40**
3.11 Detecção das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IG2a **40**
3.12 Análises estatísticas **41**
4 RESULTADOS **42**

4.1 Camundongos *Bim*$^{-/-}$ são susceptíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* 43
4.2 Falha no desenvolvimento vaginal em fêmeas *Bim*$^{-/-}$ não é responsável da mortalidade exibida no modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi* 45
4.3 Macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos *Bim*$^{-/-}$ são deficientes na produção de NO no pico da parasitemia.....46
4.4 Macrófagos *Bim*$^{-/-}$ não apresentam defeito intrínseco frente à infecção com *T. cruzi*.....47
4.5 A cavidade peritoneal de animais Bim$^{-/-}$ apresenta uma porcentagem reduzida da população SPM no pico da parasitemia 49
4.6 Esplenócitos de camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiência na produção de NO, IFN-γ e IL-6 na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* 51
***4.7* Camundongos Bim-/- apresentam uma deficiência no desenvolvimento da resposta mediada por linfócitos TCD8+ antígeno-específicos ao *T.cruzi*.....53**
4.8 Papel das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG2a na fase da regressão da parasitemia 59
5 DISCUSSÃO 63
6 CONCLUSÃO 70
REFERÊNCIAS.....72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, é uma infecção parasitária sistêmica, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (1). O agente etiológico é um parasita da família *Trypanosomatidae,* caracterizado pela presença de um único flagelo e uma única mitocôndria contendo uma complexa região de DNA extranuclear denominada cinetoplasto e localizada perto da base do flagelo (2). Essa antropozoonose foi descoberta em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, e em sua homenagem foi denominada “Doença de Chagas” (3).

Atualmente, a doença representa um problema de relevância em saúde pública mundial. Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas com o parasita no mundo, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica e mais de 25 milhões de pessoas encontrem-se em áreas de risco. Além disso, a doença representa a causa de morte de aproximadamente 10,000 a 14,000 pessoas por ano no mundo (4–6). Apesar desses dados, a Tripanossomíase americana continua sendo uma das 13 doenças mais negligenciadas do mundo conforme reconhecido pela Organização mundial da Saúde (7).

A doença de Chagas é transmitida principalmente através de insetos hematófagos da subfamília *Triatominidae* tanto para seres humanos quanto para outras 150 diferentes espécies de mamíferos selvagens e animais domésticos. *Triatoma infestans, Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies de vetores mais importantes na transmissão do *T. cruzi* para o homem. Na America latina, *Triatoma infestans* representa o principal vetor. A transmissão acontece principalmente quando o parasita entra no sangue a partir do contato das fezes do inseto vetor com a pele ferida do hospedeiro. Além dos mecanismos vetoriais, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea, via placentária ou ingestão de alimentos contaminados com o protozoário (1,6,8).

1.1.2 Ciclo de vida do T. cruzi

Durante o ciclo de vida, tanto no inseto vetor como no hospedeiro mamífero, o *T. cruzi* desenvolve complexas mudanças morfológicas que permitem sua

sobrevivência e replicação em diversas condições ambientais. O ciclo começa quando a forma tripomastigota metacíclica é depositada junto às fezes no ato de alimentação do vetor; a forma é flagelada e altamente infecciosa, circula na corrente sanguínea e invade as células de diversos tecidos, principalmente o cardíaco e intestinal. Logo após a invasão ao ambiente intracelular, o parasita se transforma na forma amastigota, essa forma aflagelada prolifera por um mecanismo de reprodução assexuada (fissão binária) e se diferencia na forma tripomastigota, as quais rompem e lisam a célula hospedeira alcançando novamente a corrente sanguínea. A forma tripomastigosta é a forma que pode ser ingerida pelo vetor e, por sua presença no sangue periférico, tem acesso às regiões em que o barbeiro se alimenta. No intestino do parasita, o protozoário diferencia–se na forma epimastigota não infecciosa. Finalmente, o parasita se transforma em formas tripomastigotas metacíclicas, dando começo novamente ao ciclo (Figura 1) (1,9).

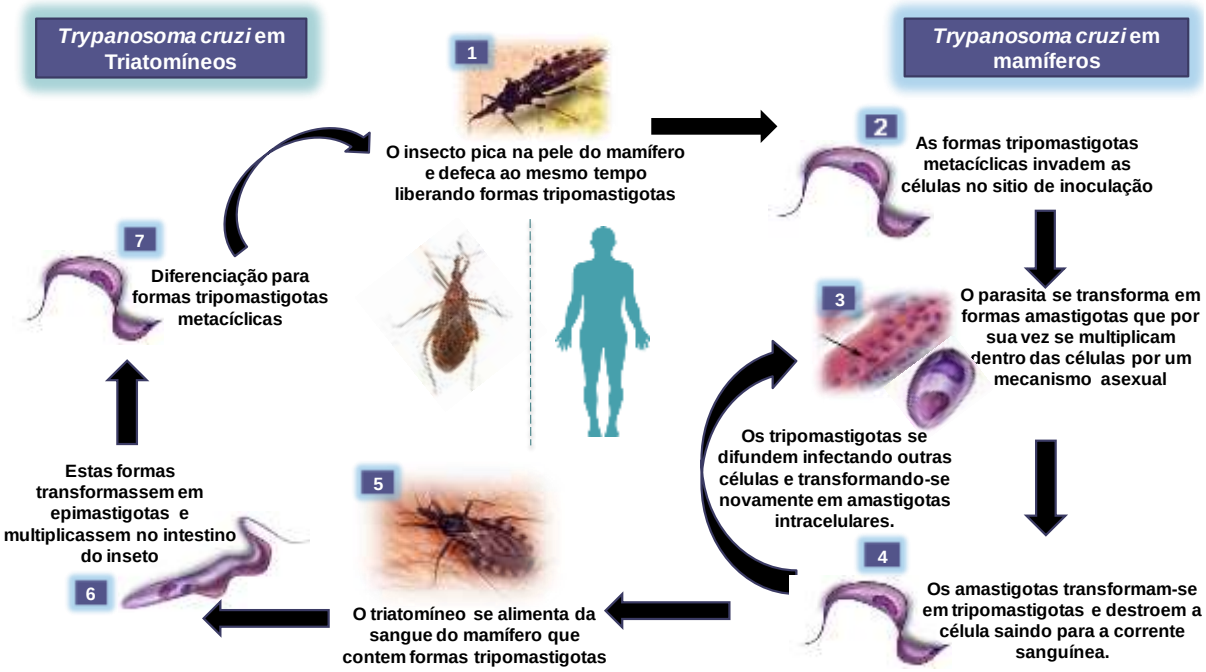

Figura 1 - Ilustração do ciclo de vida do *T. cruzi*.

1.1.3 Dados clínicos da doença de Chagas

A Tripanossomíase apresenta duas fases clínicas: uma aguda e outra crônica (5). A fase aguda acontece no início da infecção e pode durar de 2 a 4

meses, apresenta sintomatologia variável e se caracteriza por uma intensa parasitemia com presença do parasita em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo (3). Adicionalmente, há uma intensa ativação do sistema imune com altos níveis de citocinas no plasma, intensa ativação de linfócitos T e linfócitos B, linfoadenopatía e esplenomegalia (10). A fase crônica é iniciada 3 a 4 meses após a infecção inicial e pode durar por toda a vida do paciente. Aproximadamente 60% a 70% dos pacientes apresentam a forma indeterminada da doença, com ausência de signos clínicos e detecção de anticorpos específicos para o *T. cruzi* no soro. O 30% restante, desenvolve a patologia característica da infecção com destruição de tecidos musculares e nervosos, causando danos irreversíveis a diversos órgãos sendo o trato digestório (principalmente megaesôfago e megacólon) e o tecido muscular cardíaco (principalmente cardiomiopatias) os mais prevalentes (2,11).

Atualmente, as medidas preventivas para reduzir a transmissão do *T. cruzi* aos seres humanos são realizadas através de estratégias de controle dos vetores hematófagos com o uso de inseticidas e diagnóstico da doença em doadores nos bancos de sangue. O único tratamento terapêutico de pacientes infectados permanece restrito aos medicamentos benzonidazol e nifurtimox, sendo este tratamento mais eficaz em crianças e em pessoas diagnosticadas na fase aguda da infecção (1,5,12).

1.1.4 Resposta imune à infecção experimental com Trypanosoma cruzi

1.1.4.1 Resposta imune inata

Na infecção pelo *T. cruzi*, as feridas criadas na pele do hospedeiro no ato de alimentação do inseto vetor permitem a entrada e difusão dos parasitas na corrente sanguínea. Ao mesmo tempo, outras barreiras físicas como a mucosa do trato gastrointestinal na transmissão oral ou a conjuntiva dos olhos podem representar locais de ingresso do parasita (6). Após a entrada na corrente sanguínea, o *T. cruzi* age de forma direta na imunorregulação do hospedeiro seguido por uma intensa resposta inflamatória que pode causar efeitos deletérios. Na fase inicial da infecção, células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas atuam na detecção e eliminação direta de parasitas. Ao mesmo tempo, estas células são

ativadas para se tornarem células apresentadoras de antígeno eficientes capazes de ativar e desencadear uma reposta imune adaptativa. Por outro lado, o sistema imune inato tem um papel importante no reconhecimento de células não hematopoiéticas infectadas que representam um dos principais alvos do parasita (13).

O reconhecimento do parasita pelo sistema imune inato é iniciado por membros da família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os receptores do tipo Toll (TLR) têm sido o foco da maioria dos estudos. Modelos experimentais murinos deficientes da função especifica de TLRs ou das moléculas adaptadoras envolvidas na transdução de sinais (especialmente MyD88) tem sido amplamente utilizados com o objetivo de desvendar o papel destes receptores na infecção *in vivo* pelo *T. cruzi* (10). Estudos mostraram que camundongos MyD88$^{-/-}$ são altamente susceptíveis a infecção com a cepa Y to *T. cruzi*. Nestes animais, a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12p40 secretada por células da imunidade inata e a subsequente produção de IFN-γ por células TCD4^{+} do subtipo Th1 (T helper 1) foi severamente diminuída, mostrando a importância da via de ativação dependente de MyD88 na resistência do hospedeiro contra a infecção (14). Por outro lado, estudos mostraram a alta susceptibilidade de animais TLR2$^{-/-}$ e TLR9$^{-/-}$ através do aumento significativo da parasitemia e diminuição da taxa de sobrevida. Igualmente, animais duplo *knockout* para TLR2 e TLR9 mostraram uma alta susceptibilidade equivalente à observada nos animais deficientes de MyD88, indicando a importância destes receptores em conjunto no reconhecimento do *T. cruzi* (15). Além dos TLR, pela natureza intracelular do parasita, os receptores citosólicos de tipo NOD (NLR) tem um papel importante no controle da infecção. Animais NOD1$^{-/-}$ mostraram ser altamente susceptíveis ao parasita, sucumbindo na infecção e exibindo altos níveis de parasitas no sangue assim como no tecido cardíaco e no baço. (16). De igual forma, em um modelo de infecção *in vivo* pelo *T. cruzi* foi verificada a participação do inflamasomma NLRP3 no controle da parasitemia através da indução de óxido nítrico (NO) por um mecanismo dependente de caspase 1 e IL-1R (17). Estes dados sugerem que NOD1 e NLP3 são críticos no reconhecimento de formas tripomastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Após o reconhecimento do parasita, os macrófagos tem um papel central no controle da infecção pelo *T. cruzi.* Representam uma das primeiras células a serem infectadas e, portanto, funcionam como célula hospedeira do parasita assim como célula efetora da resposta imune. A primeira evidencia de que macrófagos são

críticos na resistência ao parasita foi mostrado quando a depleção deste subtipo celular por tratamento com sílica aumentou significativamente a parasitemia e as taxas de mortalidade em camundongos infectados (18). Os macrófagos, em conjunto com células dendríticas, induzem uma castata de citocinas (Figura 2). Na fase inicial da infecção, induzem a produção de interleucina-12 (IL-12), que atua sobre as células NK para estimular a secreção de interferon-gama (IFN-γ) (10,19). Em diferentes modelos experimentais tem sido mostrada a importância do IFN-γ na resistência à infecção contra o protozoário. Animais tratados com anticorpos neutralizantes contra IFN-γ (20) ou deficientes do receptor para esta citocina, apresentaram incapacidade de sobreviver após um desafio inicial (21). Além disso, após a administração de IFN-γ recombinante murino, camundongos infectados com o micro-organismo reduziram significativamente a carga parasitaria e a mortalidade em relação aos grupos controle, comprovando o papel central desta citocina na resistência contra o *T. cruzi* (22). Por sua vez, o IFN-γ e também o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) estimulam os macrófagos a sintetizarem o óxido nítrico, responsável pelo controle da multiplicação dos protozoários durante a fase aguda da infecção (Figura 2). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio derivados do NO são as moléculas efetoras da atividade microbicida contra este microrganismo. A importância desta molécula, tem sido mostrada em modelos de infecção experimental, onde camundongos C57BL/6 infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e tratados com inibidores da enzima óxido nítrico sintase mostraram aumento da parasitemia e mortalidade (23). De igual forma, camundongos deficientes do receptor de IFN-γ (IFN-γR$^{-/-}$) ou da enzima óxido nítrico sintase induzível apresentaram alta susceptibilidade a infecção pelo parasita, com significativo aumento da carga parasitaria e a mortalidade durante a fase aguda infecção (21). Finalmente, as citocinas IL-10 e IL-4 evitam a inflamação excessiva e o desenvolvimento da patologia, durante as fases agudas e crônicas, respectivamente (10,24).

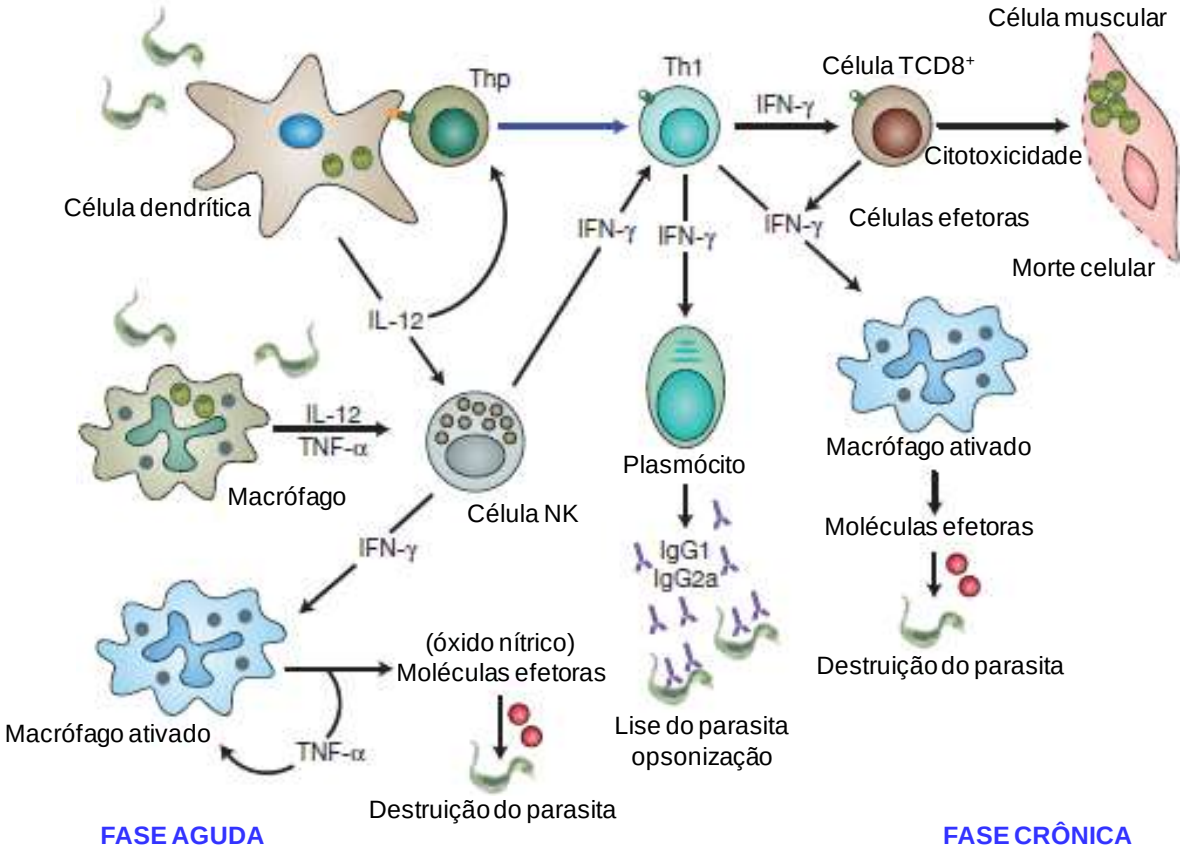

Figura 2 - Resposta imune na infecção pelo *T. cruzi.* Ilustração da resposta imune inata e adquirida desencadeada durante a infecção experimental pelo T. cruzi. Adaptado de (10)

1.1.4.2 Resposta imune adaptativa

Conforme a doença progride, células da imunidade inata (principalmente células dendríticas) fazem a ligação entre a resposta inata e adaptativa a través da apresentação de antígenos do parasita e a secreção de IL-12 importantes na diferenciação e expansão clonal de linfócitos T $CD4^+$ no subtipo Th1 assim como linfócitos T $CD8^+$ e linfócitos B. Desta maneira, a atividade citotóxica dos linfócitos T $CD8^+$ permite eliminar formas amastigotas intracelulares, o IFN-γ produzido por linfócitos $CD4^+$ do subtipo Th1 e linfócitos $TCD8^+$ melhora a eficiência de macrófagos na eliminação de formas amastigotas e tripomastigotas fagocitadas e os anticorpos produzidos por linfócitos B ativados (principalmente IgG1 e IgG2a), facilitam a lise de formas tripomastigotas extracelulares e a fagocitose de parasitas opsonizados (Figura 2) (10).

Como o parasita invade e se replica em essencialmente todos os tipos de células do hospedeiro, a imunidade mediada por células T é crucial para a resolução da infecção. Estudos mostraram que a depleção de células T $CD8^+$ ou T $CD4^+$ resulta em rápido desenvolvimento da parasitemia e morte dos camundongos. Acredita-se que linfócitos T $CD8^+$ sejam as principais células envolvidas no controle da infecção, principalmente através da produção de IFN-γ, perforina e a atividade citotóxica contra células infectadas pelo parasita (25–27). Na infecção pelo *T. cruzi*, respostas robustas mediadas por células T $CD8^+$ são vitais para o controle da replicação dos agentes infecciosos, dado que o parasita se multiplica no citoplasma de qualquer célula nucleada, incluindo macrófagos e cardiomiócitos (28). A primeira evidencia de que células T $CD8^+$ são críticas na resistência ao parasita foi demonstrada quando camundongos deficientes neste subtipo celular apresentaram incapacidade de sobreviver após um desafio inicial com o protozoário. Estudos subsequentes mostraram que a depleção de células T $CD8^+$ durante a fase crônica da infecção resulta na exacerbação da inflamação e aumento da carga parasitária no tecido muscular cardíaco. Do mesmo modo, animais *knockouts* para a proteína β2-microglobulina, que apresentam deficiência de expressão das moléculas de MHC de classe I na superfície celular e, portanto tem desenvolvimento mínimo de células T $CD8^+$, rapidamente sucumbem a infecção pelo *T. cruzi*, confirmando a importância destas células na proteção contra este microrganismo (29).

No modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi*, após o reconhecimento do antígeno cognato, células T $CD8^+$ *naïve* iniciam um processo de expansão clonal que permite aumentar até 10.000 vezes a frequência de células antígeno específicas dentro dos primeiros 15 dias após o desafio. Embora o repertório de possíveis epítopos seja grande, a resposta imunológica é restrita a poucos, fenômeno conhecido como imunodominância (30). Assim, alguns clones são expandidos em grandes quantidades (dominante) em relação a outras células T antígeno especificas (subdominante). A imunodominância pode ser o resultado de diferentes fatores que regulam a formação do complexo peptídeo-MHC I na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Esses fatores podem incluir a concentração do antígeno assim como a estabilidade e disponibilidade do epítopo após o processamento e translocação para o retículo endoplasmático antes de ser transportado na superfície da APC. Após a formação do complexo peptídeo-MHC I, fatores como a afinidade do TCR e a capacidade de ativação e proliferação dos

linfócitos T $CD8^+$ em resposta a um antígeno, podem de igual forma influenciar o fenômeno de imunodominância (31). O genoma do *T. cruzi* codifica mais de 12.000 genes, proporcionando milhares de potenciais epítopos que poderiam ser apresentados pelo MHC-I na superfície de células do hospedeiro infectadas com o parasita (32). Na infecção experimental *pelo T. cruzi*, a resposta dos linfócitos $TCD8^+$ é altamente limitada aos epítopos expressos por diferentes membros de uma grande família de antígenos de superfície do *T. cruzi* denominada trans-sialidases (TS) (33). Em camundongos C57BL/6, aproximadamente 30% do total das células $TCD8^+$ antígeno especificas no pico da infecção são especificas para o peptídeo imunodominante TsKb20 (ANYKFTLV) e 4-10% são especificas para o peptídeo subdominante TsKb18 (ANYDFTLV). Igualmente, a resposta é imunodominante à o peptídeo PA8 (VNHRFTLV) da proteína 2 de superfície de amastigotas (ASP-2) (34).

Após a fase de expansão clonal e conforme o parasita é controlado inicia-se a fase de retração. Apesar disso, o *T. cruzi* consegue estabelecer uma infecção que é persistente mas que inicialmente não é controlada pela ação de células T $CD8^+$ antígeno especificas. Isso porque, o pico da resposta imune medida pelos linfócitos T $CD8^+$ antígeno específicos acontece aproximadamente 30 dias depois o desafio. Este atraso no desenvolvimento da resposta imune provavelmente permite que o parasita estabeleça uma infecção latente no tecido antes de ser eliminado eficientemente pelas células citotóxicas (30,35).

Além da resposta mediada por linfócitos T, a imunidade humoral também representa um dos mecanismos importantes de defesa no controle da infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que a depleção de células B leva ao aumento da parasitemia e a persistência do parasita. Tem sido previamente mostrado por alguns trabalhos da literatura que o parasita induz a ativação de células B policlonais durante a fase aguda da infecção. Em camundongos C57Bl/6 resistentes, diferentes trabalhos mostram um aumento da IgM total circulante na fase inicial da doença, seguido por um aumento da IgM antígeno específica. À medida que o parasita é eliminado da corrente sanguínea, as imunoglobulinas mudam de classe para uma resposta mediada por IgG total e IgG específica. (36–39). Além disso, os anticorpos produzidos pelas células B tem um papel importante na lise de formas tripomastigotas extracelulares e na fagocitose de parasitas opsonizados com IgGs especificas. (39).

1.2 Proteína Bim

A proteína Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*) foi identificada em 1998 por 2 grupos de pesquisa independentemente como uma proteína de ligação à molécula Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2 protein family*) (40,41). Bcl-2 é uma família de aproximadamente 25 proteínas com atividade pró e anti-apoptótica amplamente descrita. Esta família tem sido dividida em 3 grupos: as proteínas anti-apoptóticas do tipo Bcl-2 que possuem os 4 domínios de homologia BH (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), as proteínas pró-apoptóticas que compartilham de 1 a 3 regiões dos domínios característicos (Bax, Bak) e um amplo grupo de proteínas "*BH3-only*" chamadas assim porque contem apenas um domínio homólogo ao terceiro domínio conservado de Bcl-2 (Bim, Bid, Bad, Puma, Noxa). Bim é uma potente molécula pró-apoptótica que pertence à subfamília "*BH3-only*" (Figura 3) (42).

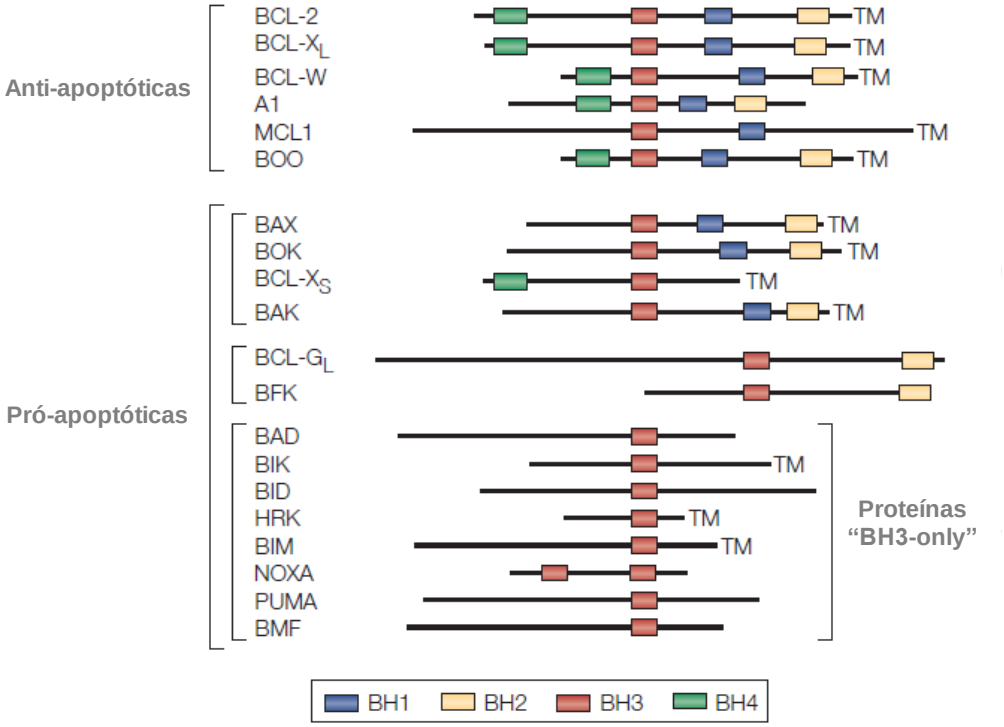

Figura 3 - Proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2. Esquema representativo dos membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2. Adaptado de (43)

Atualmente, tem sido descritas 19 isoformas diferentes da proteína Bim. As três principais variantes descritas em camundongos são BimS (*Short*), BimL (*Long*) e BimEL (*Extra Long*), sendo está ultima a mais abundante. As três isoformas contem

um domínio BH3 e um domínio transmembrana (TM) importantes na função apoptótica. Em condições fisiológicas, BimL e BimEL encontram-se expressas em diferentes tipos de células em sua forma inativa ligada ao complexo motor dineína associado a microtúbulos através da interação com a cadeia leve de dineína (LC8). Contrario a isso, BimS é quase indetectável, sendo expressa em um número limitado de células e sem a interação com o complexo motor dineína (44,45).

1.2.1 Ativação da proteína Bim

Em consequência da privação de fatores antigênicos ou citocinas, assim como da presença de agentes citotóxicos, Bim pode ser ativada através de três mecanismos diferentes. Inicialmente, através da liberação do complexo motor dineína ou da associação com algum dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (46). Em segundo lugar, no nível transcripcional, aumentando o mRNA de Bim pela ação dos fatores de transcrição da família *forkhead box* (FOXO3a), que por sua vez são inibidos pelas vias de sobrevivência ERK1⁄2 e Akt/PKB sob condições fisiológicas. Finalmente, no nível pós-transcripcional através da fosforilação pela via JNK que aumenta sua atividade apoptótica (46,47).

Uma vez que a proteína Bim é ativada, pode induzir a via intrínseca ou mitocondrial de apoptose através de 2 mecanismos. Bim pode se ligar e ativar diretamente as proteínas pró-apoptóticas Bax (*Bcl-2-associated X protein*) e Bak (Bcl-2 antagonist killer 1) ou pode interagir com as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e MCL-1, levando à liberação e transferência mitocondrial de Bax e Bak (45). Estas proteínas por sua vez, se oligomerizam e se inserem na membrana mitocondrial externa levando à formação do MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) e ao extravasamento de alguns componentes mitocondriais para o citoplasma como, por exemplo, o citocromo c, SMAC/DIABLO e Omi/HtrA2. O citocromo c ativa à proteína Apaf-1(*Apoptotic protease activating factor 1*) e junto com a forma inativa da caspase-9 levam a formação do complexo multiproteico conhecido como apotossomo. O complexo ativa caspases em cascata, inicialmente cliva a pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que por sua vez cliva e ativa as caspases efetoras 3 e 7 levando a fragmentação do DNA nuclear e outras alterações que finalmente culminam na morte celular apoptótica. Por outro lado, o SMAC/DIABLO e Omi/HtrA2 antagonizam a função anti-apoptótica de uma família de

inibidores conhecida como IAPs (*Inhibitors of apoptosis protein*) aumentando desta maneira, a indução de apoptose pelo citocromo c (45,48).

In vitro, Bim resulta essencial na indução da apoptose de diferentes tipos celulares, incluindo linfócitos, osteoclastos, osteoblastos, mastócitos, células epiteliais, células endoteliais, macrófagos, granulócitos e neurônios. *In vivo*, Bim é um regulador crítico para o desenvolvimento adequado de diferentes respostas imune. A deficiência de Bim provoca acúmulo anormal de células linfóides e mielóides, levando ao desenvolvimento de uma doença linfoproliferativa e autoimune sistêmica. Além disso, a proteína Bim tem um papel importante na espermatogênese, a formação de glândula mamária e a manutenção da homeostase do esqueleto (48).

1.2.2 Camundongos deficientes da proteína Bim

Os camundongos Bim$^{-/-}$ foram inicialmente criados pela substituição do exon contendo o domínio BH3 por um *neo cassette* (44). Estes animais, embora férteis e saudáveis, são obtidos em baixas quantidades em comparação com animais selvagens, sugerindo que Bim tem um papel importante no desenvolvimento embrionário (49). A proteína Bim se encontra expressa em diferentes células hematopoiéticas e sua deficiência afeta significativamente a homeostase deste compartimento. Em animais Bim$^{-/-}$, embora o número de glóbulos vermelhos é normal, o número de leucócitos aumenta significativamente. Assim, granulócitos, monócitos, linfócitos T (CD4^{+} e CD8^{+}) e linfócitos B incrementam de 2 a 4 vezes o número total de células (44). Conforme os animais vão envelhecendo, desenvolvem esplenomegalia, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia e uma doença autoimune sistêmica similar ao lúpus eritematoso sistêmico em humanos (45). Assim, o baço da maioria dos camundongos incrementam de 5 a 10 vezes seu tamanho em comparação com animais WT. Os plasmócitos representam a população de células que aumenta de forma mais acelerada com a idade. Células produtoras de IgM aumentam até 4 vezes enquanto as secretoras de IgG apresentam concentrações 30 a 200 vezes mais elevadas que os animais selvagem. De igual forma, camundongos Bim$^{-/-}$ de 6 a 12 meses de idade possuem uma produção de IgM até 3 vezes maior, IgG 10 vezes mais alta e IgA 3 vezes maior que a secreção observada

em animais WT. Em camundongos Bim$^{+/-}$, esse aumento é ligeiramente maior ao observado em animais WT (49).

1.2.3 Papel da proteína Bim nas infecções

Em relação ao papel e a importância de Bim no curso de uma infecção, no modelo murino de *Leishmania major*, a ausência dessa proteína pró-apoptótica resultou em uma maior resistência à infecção e maior frequência de células T CD4^{+} antígeno especificas nas fases tardias. Interessantemente, após a reinfecção, os camundongos Bim$^{-/-}$ apresentaram maior proteção contra o parasita através do aumento significativo do número de células T CD4^{+} antígeno específicas produtoras de IFN-γ e ausência da produção de IL-10 no local da infecção, sugerindo um papel limitante de Bim no controle da doença (50). Por outro lado, em um modelo de hepatite mediada pelo vírus da coriomeningite linfocítica, Bim mostrou um papel duplo no controle da infecção. Por um lado, a ausência da expressão da proteína nos hepatócitos levou a uma diminuição do dano hepático mediado por linfócitos T, enquanto que a perdida da expressão de Bim no compartimento hematopoiético aumentou moderadamente a severidade da doença (51). De forma similar, em um modelo de infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), camundongos deficientes da proteína Bim e do receptor Fas mostraram um aumento significativo no número de células TCD8^{+} antígeno específicas de memória. Contudo, as células T CD8^{+} diminuíram sua capacidade efetora com o tempo devido à diminuição da capacidade de proliferação (52,53). No modelo de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a morte celular induzida em macrófagos e fibroblastos mostrou ser um fenômeno dependente de Bim. Além disso, Bim mostrou ser um dos fatores críticos que promove a propagação e virulência do patógeno, uma vez que a inibição da proteína pro-apoptótica diminuiu a capacidade de infectar novas células (54). No entanto, não há relatos na literatura sobre o papel de Bim na resposta imune no modelo de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Além disso, a literatura é insuficiente em trabalhos que relacionam o papel da proteína Bim a resposta imune em modelos de infecção por outros micro-organismos. Dessa forma, o presente trabalho busca expandir o conhecimento do papel de Bim na resposta imune a doenças infecciosas no modelo de infecção murina pelo *Trypanosoma cruzi* e descrever sua importância na resposta imune dessa doença.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar o papel da proteína Bim na resposta imune contra o *Trypanosoma cruzi* durante a infecção experimental.

Metas específicas

- Avaliar a resposta imune e o curso da infecção experimental em animais C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6 selvagens (*Bim*$^{+/+}$), *knockout* para o gene Bim (*Bim*$^{-/-}$) e *Bim*$^{+/-}$ (representam o melhor controle por compartilhar um alelo com os animais *knockouts*), fêmeas, de 8-20 semanas de idade, foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo e mantidos em condições SPF (*Specific-pathogen free*). Os procedimentos experimentais foram avaliados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do ICB-USP e sua aprovação encontra-se registrada sob nº 117 nas folhas 11 livro 3.

3.2 Manutenção dos camundongos *Bim*$^{-/-}$

Os camundongos *Bim*$^{-/-}$ foram, gentilmente, cedidos pelo Dr. Andreas Strasser do "The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research" na Australia. Conforme reportado pelo Dr. Strasser, assim como informação obtida da equipe técnica do Jackson Laboratory, foram feitos cruzamentos entre fêmeas *Bim*$^{+/-}$ com machos *Bim*$^{-/-}$ com o objetivo de maximizar o número de filhotes por ninhada. Isto, devido a um defeito embriológico da vagina da maioria das fêmeas *Bim*$^{-/-}$, que embora muitas vezes férteis, tem uma baixa taxa de reprodução.

3.3 Genotipagem de camundongos *Bim*$^{-/-}$ e *Bim*$^{+/-}$

Todos os animais obtidos do cruzamento anteriormente descrito foram devidamente marcados e genotipados, já que segundo a distribuição mendeliana só metade deles resulta *knockout* para a proteína Bim. Assim, um milímetro da cauda de cada camundongo foi cortada e ressuspendida em 400 µL de tampão de lise contendo 200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL, 5 mM EDTA, 0,2% SDS e 100 µg/mL de proteinase K (Invitrogen). As amostras foram deixadas sob incubação no *Thermomixer comfort* (Eppendorf) a 56 ºC, 750 rpm, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm, 4 ºC por 5 minutos e o sobrenadante transferido para outro *eppendorf* com 400 µL de isopropanol; o tubo foi invertido 15 vezes verificando a precipitação do DNA. Em seguida, uma segunda centrifugação foi feita a 12000 rpm, 4 ºC por 10 minutos; o sobrenadante foi descartado e foram

adicionados 500 µL de etanol 70% gelado para centrifugar de novo a 12000 rpm, 4 ºC por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados secando no fluxo laminar. Após 45 minutos, o *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de TE, levado no *Thermomixer* a 64 ºC por 30 minutos para completar a diluição do DNA e feita a quantificação no *Nanodrop 2000* (ThermoScientific).

Após a quantificação, as amostras foram diluídas até ficarem na concentração de 50 µg DNA/mL e amplificadas por PCR convencional. Cada reação estava composta de 1,08 µL de 10 X PCR Buffer, 0,32 µL de 50 Mm MgCl2, 0,22 µL de cada *primer* (PB20, PB65, PB335) (Tabela I), 0,11 µL de 10mMdNTPs, 0,43 µL da Taq DNA polimerase, 7,4 µL de dH_2O e 2 µL de DNA (50 µg/mL). Todos os reagentes usados na reação foram da Invitrogen. O perfil térmico aplicado no termociclador (Thermo Electron's Corporation Px2 Thermal Cycler) foi o seguinte: 4 min a 9 ºC, 30 ciclos de 30s a 94 ºC, 30s a 50 ºC, 1 min a 72 ºC e 5 min a 72 ºC. Finalmente a detecção foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, verificando a presença de 1 banda de 400pb para os animais WT, 1 banda de 540pb para os *Bim*$^{-/-}$ e as 2 bandas para os camundongos *Bim*$^{+/-}$, conforme mostrado na figura 4.

	Sequência dos primers
PB20	CAT TCT CGT AAG TCC AGA TCT
PB65	CTC AGT CCA TTC ATC AAC AG
PB335	GTG CTA ACT GAA ACC AGA TTA G

Tabela I- Sequência de oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para genotipar camundongos Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$.

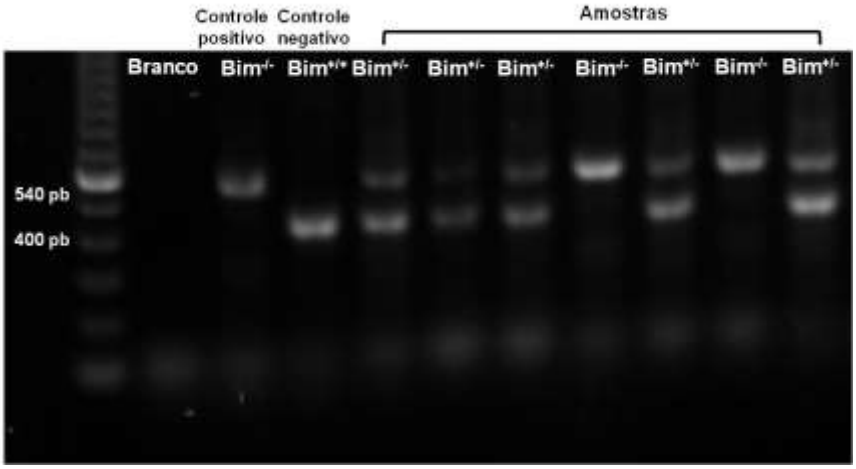

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% para genotipagem de camundongos *Bim*$^{-/-}$ e *Bim*$^{+/-}$. O fragmento esperado de amplificação foi de 400pb para os animais WT, 540pb para os *Bim*$^{-/-}$ e os dois fragmentos para os camundongos *Bim*$^{+/-}$.

3.4 Infecção e avaliação da parasitemia e mortalidade

Os animais foram infectados intraperitonealmente (i.p.) com 200 µL PBS, contendo 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, obtidas de sangue de animais A/J previamente infectados durante 7 dias. Estes experimentos foram feitos sob supervisão do Prof. Dr. Jose Maria Alvarez Mosig, do Departamento de Imunologia, ICB-USP. A parasitemia e a mortalidade foram acompanhadas diariamente e individualmente até o número de parasitas zerarem. Lâminas de esfregaço sanguíneo foram feitas com 5 µL de sangue obtidos da veia da cauda de cada animal, sendo determinada a parasitemia pela contagem do número de parasitas móveis em cinquenta campos aleatórios sob objetiva de 40 x.

3.5 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

Com o objetivo de determinar os linfócitos T CD8+ específicos para o epítopo imunodominante PA8 H-2K^b ASP-2 (VNHRFTLV) e o peptídeo subdominante TsKb18 H-2K^b (ANYDFTLV) do *Trypanosoma cruzi*, foram realizados ensaios de citotoxicidade *in vivo* baseado no modelo experimental de Machado e colaboradores (55). Os peptídeos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues do CTCMol, UNIFESP.

3.5.1 Obtenção de esplenócitos

Para a obtenção dos esplenócitos, camundongos C57BL/6 foram sacrificados por inalação de Halotano (Cristália), seguido por deslocação cervical. Foi sacrificado 1 animal doador (obtendo aproximadamente 1 x 10^8 esplenócitos por baço) para cada 2 animais receptores. Após o sacrifício, os baços foram coletados e macerados em meio RPMI suplementado com SFB 10%. Em seguida, as suspensões de esplenócitos foram incubadas durante 10 minutos a 4 °C com o fim de decantar restos do tecido. Após o período de incubação, o sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 500 g por 5 minutos. Os eritrócitos foram lisados usando 1 mL de tampão de lise (0,15 M NH_4Cl, 1 mM $KHC0_3$, 0,1 mM Na EDTA, pH 7.2-7.3) por baço. Após 2 minutos de incubação, a reação foi neutralizada com 4 mL de RPMI 10% por cada 1 mL da suspensão celular e centrifugado novamente a 500 g por 5 minutos. Finalmente as células foram ressuspendidas em RPMI 10% e a viabilidade e concentração celular foram avaliadas utilizado o corante azul de tripan em câmara de Neubauer.

3.5.2 Marcação, pulsação e transferência de esplenócitos

Os esplenócitos anteriormente obtidos foram divididos em três ou quatro populações e marcados com os corantes vitais CFSE Cell Proliferation Kit (CFSE – Molecular Probes) e CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit (Molecular Probes) em uma concentração final de 10 µM ($CFSE^{high}$, $CellTrace^{high}$) ou 1 µM ($CFSE^{low}$, $CellTrace^{low}$) em PBS por 15 minutos a 37 °C. Após centrifugação a 500 g por 5 minutos, as populações $CFSE^{high}$, $CellTrace^{high}$ e $CellTrace^{low}$ foram ressuspendidas em RPMI 10% SFB pré-aquecido e pulsadas por 1 hora a 37 °C com 1 µM dos peptídeos TsKb18 e TsKb20 ou as concentrações 0,000 1µM, 0,01 µM, e 1µM do peptídeo PA8. As células $CFSE^{low}$ permaneceram não pulsadas. Em seguida, as células pulsadas foram lavadas e misturadas na mesma proporção de células $CFSE^{low}$ antes de serem injetadas intravenosamente (via retro-orbital) na concentração de 4 x 10^7 células em 200 µL de RPMI não suplementado, por camundongo. Os animais receptores foram camundongos *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ infectados ou não 8 ou 11 dias antes do inicio do experimento com 1 x 10^4 formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Após 16-20 horas da transferência, os esplenócitos dos

camundongos recipientes foram coletados, processados, lavados 3 vezes com RPMI 10% e fixados com paraformaldeído 1% diluído em PBS.

3.5.3 Analise por citometria de fluxo

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, no FacsCanto II (Becton Dickinson) e posteriormente no *software* Flowjo (TreeStar). A estratégia de *gate* utilizada foi a seguinte: FSC-A x FSC-H para excluir *doublets*, FSC-A x SSC-A para excluir *debris* celular e finalmente CFSE x CellTrace para determinar as populações de esplenócitos marcadas com os corantes vitais (Figura 5). Dez mil eventos foram adquiridos na janela da população $CFSE^{low}$ que representa o grupo controle de células não pulsadas. A porcentagem de lise específica foi determinada usando a fórmula:

$$1 - \frac{\%\ \mathrm{CFSE_{high}}\ \text{infected} / \%\ \mathrm{CFSE_{low}}\ \text{infected}}{\%\mathrm{CFSE_{high}}\ \text{naive} / \%\mathrm{CFSE_{low}}\ \text{naive}} \times 100\%.$$

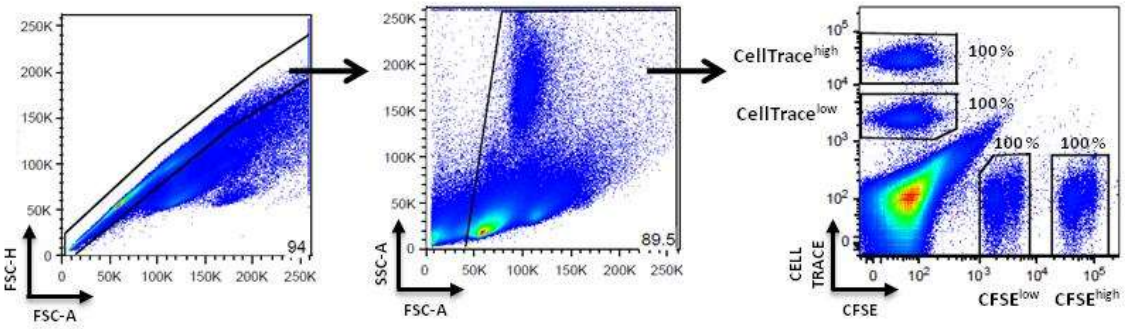

Figura 5 - Estrategia de *gate* utilizada no ensaio de citotoxicidade in vivo. Os *gates* FSC-A x FSC-H foram utilizados para excluir *doublets*, FSC-A x SSC-A para excluir debris celular e finalmente CFSE x CellTrace para determinar as populações de esplenócitos marcadas com os corantes vitais.

3.6 ELISPOT

Foi feito o ensaio de ELISPOT para a determinação das células antígeno específicas para o peptídeo imunodominante PA8 produtoras de IFN-*γ,* seguindo os protocolos descritos por Boscardin e colaboradores (56). Inicialmente, em uma placa de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen HA Millipore) foram adicionados 60 µL por poço de PBS estéril contendo 10 ng/mL do anticorpo de captura monoclonal anti-IFN-*γ* de camundongo (R4-6A2 BD Pharmingen). A placa foi incubada a temperatura ambiente *overnight.* No dia seguinte, foram realizadas três lavagens com 100 µL de

RPMI em condições estéreis e foi realizado o bloqueio com 100 µL de meio RPMI contendo 10% SFB durante 2 h a 37 °C.

As células respondedoras foram obtidas do baço de animais $Bim^{+/+}$, $Bim^{+/-}$ e $Bim^{-/-}$ previamente infectados ou não com 1 x 10^4 formas tripomastigotas do *T. cruzi* e ressuspendidas em uma concentração final de 1 x 10^6 cels/mL em meio RPMI suplementado com NEA (Non essencial aminoacids) 1% (Gibco), L-glutamina 1% (Gibco), β-Mercaptoetanol 0,1% (Gibco), piruvato de sódio 1% (Gibco), penicilina e estreptomicina 1% (Gibco), SFB 10% (Gibco) e 10 ng/mL de IL-12 recombinante humana. Esplenócitos de animais C57BL/6 foram usados como células apresentadoras de antígeno em uma concentração de 3 x 10^6 cels/mL. Cem microlitros de cada suspensão (células respondedoras e apresentadoras) foram colocadas em cada poço e incubadas ou não com o peptídeo PA8 em uma concentração final de 10 µM durante 24 h a 37 °C e 5% CO_2 em condições estáticas. Após este processo, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS Tween 20 (0,05%) (Fisher Scientific). Em seguida, foram adicionados 75 µL por poço do anticorpo biotinilado diluído em PBS Tween 20 (0,05%) na concentração final de 2 µg/mL (XMG 1.2 BD Pharmingen). A placa foi incubada a 4°C *overnight.* No dia seguinte, a placa foi lavada 5 vezes com PBS Tween 20 (0,05%) e 3 vezes com PBS. Seguidamente, foram adicionados 100 µL por poço de PBS Tween 20 (0,05%) contendo o complexo estreptavidina-peroxidase (BD Pharmingen) em uma diluição 1:800. A placa foi incubada durante 2 horas a temperatura ambiente e posteriormente lavada 3 vezes com PBS Tween 20 (0,05%) e 5 vezes com PBS. Finalmente, a placa foi revelada com 100 µL por poço da solução contendo Tris-HCL 50 µM pH 7.5, 1 mg/mL de DAB + 1 µL/mL de H_20_2 (Sigma) durante 15 minutos. A reação foi interrompida e a placa lavada com água corrente. A placa foi secada a temperatura ambiente e os “spots” quantificados no leitor automático para ELISPOT (AID ELR06).

3.7 Detecção das citocinas IFN-γ e IL-6

Esplenócitos de animais *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ previamente infectados ou não com 1 x 10^4 formas tripomastigotas do *T. cruzi* foram incubados em placas de 48 poços (Costar) na concentração 3 x 10^6 cels/300 µL. Os sobrenadantes foram coletados após 24 e 48 horas para a detecção das citocinas IL-6 e IFN-γ,

respectivamente. Foi realizado um ELISA *sandwich* de captura utilizando o kit comercial da BD (OptEIA™) de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, em uma placa de 96 poços (Costar 3590) foram adicionados 100 µL por poço do anticorpo de captura (1:250) diluído em Carbonato de Sódio 0.1 M, pH 9.5. A placa foi incubada *overnight* a 4 °C. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com 300 µL por poço de PBS Tween 20 0,05% (Fisher Scientific) e em seguida foi feito o bloqueio com 200 µL por poço de PBS com SFB 10%, pH 7.0 por 1 h a temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes com 300 µL por poço de PBS Tween 20 0,05%. Após a última lavagem, foram adicionados 100 µL por poço das amostras ou a curva padrão diluída em PBS com SFB 10% por 2 h a temperatura ambiente. Os níveis das citocinas foram determinados utilizando a curva padrão de IL-6 recombinante murino (na concentração inicial 4 ng/mL) e IFN-γ recombinante murino (na concentração inicial 2,3 ng/mL). Após esse período, foram realizadas três lavagens com 300 µL por poço de PBS Tween 20 0,05% e foram adicionados 100 µL por poço do complexo formado pelo anticorpo de detecção (1:250) e estreptavidina-peroxidase (1:250) diluído em PBS com SFB 10%. Após 1 h de incubação a temperatura ambiente, foram realizadas 7 lavagens com 300 µL por poço de PBS Tween 20 0,05%. Finalmente, a placa foi incubada com 100 µL por poço do substrato TMB (Tetrametilbenzidina) (Thermo Scientific) por 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A absorbância foi lida no espectrofotômetro (Epoch- Biotek VGP 3200) no cumprimento de onda de 450 nm.

3.8 Detecção de oxido nítrico

Esplenócitos de animais *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ previamente infectados ou não foram incubados em placas de 48 poços (Costar) na concentração 3 x 10^6 cels/300 µL. Após 48 h de incubação, os sobrenadantes foram coletados e a concentração de oxido nítrico (NO) foi determinada pela reação de Griess. Uma vez que a molécula de NO é pouco estável e é degradada rapidamente a nitrito (NO_2-), os níveis de NO foram determinados indiretamente a través da quantificação de nitrito no sobrenadante da cultura de esplenócitos.

Brevemente, em uma placa de 96 (Costar 3590), 50 µL da solução do reagente de Griess (sulfanilamida 1%, N-1-naphitiletilenodiamida 0,1%, ácido fosfórico 2%) foram adicionados a cada poço contendo 50 µL da amostra e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. A curva padrão foi feita utilizando diluições seriadas de $NaNO_2$ na concentração inicial 50 µM. A absorbância foi lida no espectrofotômetro (Epoch- Biotek VGP 3200) no cumprimento de onda de 540 nm.

3.9 Fenotipagem de macrófagos peritoneais

As células da cavidade peritoneal foram obtidas da lavagem do peritônio com 5 ml de PBS estéril gelado. Após a obtenção, as células foram ressuspendidas em RPMI 10% e a viabilidade e concentração celular foram avaliadas utilizado o corante azul de tripan em câmara de Neubauer. Após a contagem, 1 x 10^6 cels foram incubadas com 25 µL da solução dos anticorpos monoclonais para CD19-Pecy7, CD11c- APCCy7, F4/80- PE e MHC-II- FITC. As amostras foram incubadas por 30 min a 4 °C no escuro. Após esse período, as células foram lavadas 2 vezes com 200 µL de tampão MACS (PBS 1 x, SFB 0.5%, 2 mM EDTA) e fixadas com paraformaldeído 1% diluído em PBS.

As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, no FacsCanto II (Becton Dickinson) e posteriormente no *software Flowjo* (TreeStar). A estratégia de *gate* utilizada foi a seguinte: FSC-A x FSC-H para excluir *doublets*, CD19 x FSC-H para excluir Linfócitos B, CD11c x FSC-A para excluir células dendríticas, F4/80 x SSC-A para selecionar a população de macrófagos F4/80+ e F4/80 x MHC-II para determinar as populações de macrófagos no peritônio, SPM (*Small peritoneal macrophage*) e LPM (*Large peritoneal macrophage*).

3.10 Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais com *T. cruzi*

3.10.1 Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$ *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram inoculados i.p. com 2 mL de amido de batata a 1,5% (Sigma) diluído em PBS, com o objetivo de aumentar o numero de macrófagos peritoneais. Após 4 dias, os camundongos foram sacrificados por inalação de Halotano (Cristália), seguido por deslocação cervical.

Em seguida, foram injetados 5 ml de PBS estéril gelado na cavidade peritoneal e realizados leves batimentos para descolar as células aderidas e obter a suspensão celular (aproximadamente 6 x 10^6 células por peritônio). As células foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 min, e ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 3% de SBF, a viabilidade e concentração celular foi avaliada utilizado o corante azul de tripan em câmara de Neubauer.

3.10.2 Cultura de macrófagos e infecção in vitro com T. cruzi

Após a contagem, as células foram distribuídas em placas de 96 poços (Costar), na concentração 3 x 10^5 células por poço para a avaliação da infecção e 1x10^6 células por poço para a detecção de oxido nítrico. As placas foram incubadas em meio RPMI 3% por 3 h, a 37 °C. Após esse período, as células não aderentes foram retiradas com 2 lavagens de 200 µL de meio RPMI 3% pré-aquecido. Em seguida, os macrófagos peritoneais que ficaram aderidos na placa, foram infectados por 2 h com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (5 parasitas/cel) obtidos da cultura de células epiteliais de rim de macaco ($LLCMK_2$). Após o período de infecção, os parasitas extracelulares foram removidos com 2 lavagens de 200 µL de meio RPMI 3% e foi adicionado ou não IFN-*γ* recombinante na concentração 10 ng/mL. Finalmente, 2 h e 48 h após a ultima lavagem, as placas foram fixadas com 200 µL de metanol e marcadas com 100 µL de DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole) (Sigma) na concentração 5 µg/mL. A porcentagem de macrófagos infectados foi avaliada por microscopia de fluorescência sob objetiva de 40x e pela contagem no *software ImageJ.*

3.11 Detecção das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IG2a

Com o objetivo de verificar a concentração total dos anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a foi feito um ELISA de captura e para a detecção de anticorpos específicos para *T. cruzi* foi feito um ELISA indireto. Brevemente, 10 µL de sangue foram obtidos do corte da cauda de cada animal e diluídos em 90 µL de PBS. As amostras foram centrifugadas a 3000 g durante 5 min recuperando desta maneira o sobrenadante contendo o soro.

Inicialmente, para a detecção de anticorpos totais, em uma placa de 96 poços (Costar 3590) foram adicionados 50 µL por poço do anticorpo de captura (1:100) diluído em bicarbonato de Sódio (pH 8,2). Para a detecção de *anticorpos específicos* para *T. cruzi*, foram adicionados 50 µL por poço de tampão carbonato/bicarbonato (0,005 M pH 9,6) contendo 50 µg/mL do antígeno *T. cruzi.* O antígeno foi obtido da lise de formas tripomastigotas por choque térmico. As placas com o anticorpo de captura e o antígeno, respectivamente, foram incubadas *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, foram realizadas 3 lavagens com 200 µL de PBS Tween 20 0,05% (Fisher Scientific). Após a ultima lavagem, foi realizado o bloqueio com 200 µL de PBS BSA 1% por 2 h à temperatura ambiente. Após este processo, foram realizadas novamente 3 lavagens com 200 µL de PBS 1 x Tween 20 0,05%. Em seguida, foram adicionados 100 µL por poço dos soros testados diluídos em PBS BSA 1% Tween 20 0,05% e incubados sob agitação a temperatura ambiente. Nos poços da curva padrão foi adicionado o mesmo volume contendo os anticorpos IgM e IgG2a na concentração 15,62 ng/mL e IgG1 na concentração 7,81 ng/mL. Todos da *Southern Biotech*. Após 2 h de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de PBS 1 x Tween 20 0,05%. Em seguida, foram adicionados 50 µL por poço do anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase e diluído em PBS BSA 1% Tween 20 0,05%. Após 1 h, foram adicionados 100 µL do substrato TMB (Tetrametilbenzidina) (Thermo Scientific) no escuro, com leituras a cada 5 min. A absorbância foi lida no espectrofotômetro (Epoch- Biotek VGP 3200) no cumprimento de onda de 650 nm.

3.12 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* computacional *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation,* versão 5. Os testes usados foram o one- way ou two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni e o teste de Log-Rank, conforme indicado em cada gráfico do manuscrito. Valores de $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) e $p<0,001$ (***) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Camundongos *Bim*$^{-/-}$ são susceptíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Com o objetivo de verificar o papel da proteína Bim na resposta imune contra o *T. cruzi*, inicialmente foi caracterizado o curso da infecção experimental neste modelo murino. Assim, camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram inoculados i.p. com 1x10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Após a imunização, nós observamos que os animais *Bim*$^{+/+}$ (WT) apresentaram um pico da parasitemia no dia 7 como reportado na literatura e conseguiram reduzir rapidamente o número de parasitas no sangue durante os dias 8 a 16 após infecção (Figura 6). Igualmente, camundongos *Bim*$^{+/-}$ constituíram o grupo de animais controle por apresentarem um fenótipo similar ao dos animais WT e por terem nascido dos mesmos pais que deram origem aos animais *Bim*$^{-/-}$, representando o melhor controle genético. Nestes animais, a curva de parasitemia apresentou um comportamento similar ao descrito para os animais WT, sem diferenças estatísticas, com o pico no dia 8 seguido da rápida redução do número de parasitas no sangue (Figura 6).

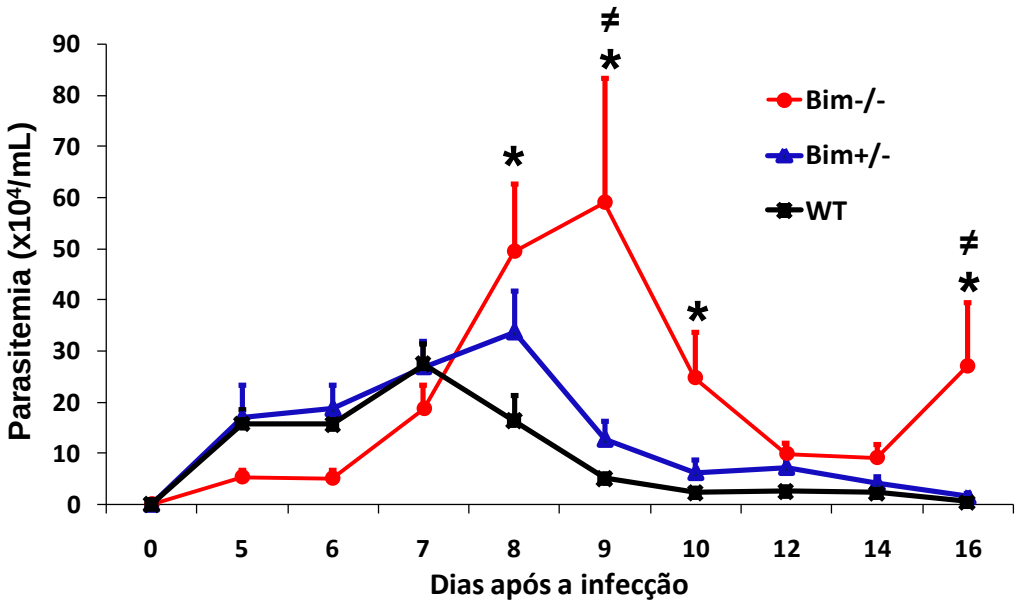

Figura 6 - Camundongos *Bim*$^{-/-}$ são susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram inoculados i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. A parasitemia foi acompanhada diariamente do dia 5 a 16 após a infecção. Os resultados são expressos como a média e o erro padrão de cada grupo (n=10) e representam a somatória de 2 experimentos. O asterisco (*) representa diferenças estatisticamente significativas entre os animais *Bim*$^{-/-}$ e *Bim*$^{+/+}$ e o símbolo ≠ indica diferenças estatisticamente significativas entre os grupos *Bim*$^{-/-}$ e *Bim*$^{+/-}$. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, (p>0,05).

Entretanto, animais *Bim*$^{-/-}$ apresentaram um atraso no desenvolvimento da parasitemia. Assim, o número máximo de parasitas nesses animais foi observado durante os dias 8 ou 9 após a infecção e foi significativamente diferente da curva dos animais selvagens ou *Bim*$^{+/-}$ (Figura 6). Ao mesmo tempo, camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentaram deficiência no controle da replicação do parasita e não conseguiram reduzir rapidamente o número de tripomastigotas no sangue como observado no grupo de animais controle, sendo este processo atrasado e observado a partir do dia 10 após a infecção como mostrado na Figura 6. De forma interessante, 25% dos animais *Bim*$^{-/-}$ não conseguiram controlar a infecção, apresentando um segundo pico de parasitemia e morrendo a partir do dia 12 após o desafio inicial (Figura 7). Os 75% restante controlaram o número de parasitas até o ponto de se tornar indetectável e sobreviveram até a fase crônica da doença. Raramente e em casos pontuais, animais WT, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{+/-}$ morreram na fase crônica após o dia 30 da imunização por motivos ainda não identificados. Assim, de forma surpreendente, nossos resultados sugerem um papel importante da proteína Bim no controle da infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que na ausência do fator pró-apoptótico houve deficiência no controle do número de parasitas pelo sistema imune na fase aguda da infecção e maior mortalidade dos animais.

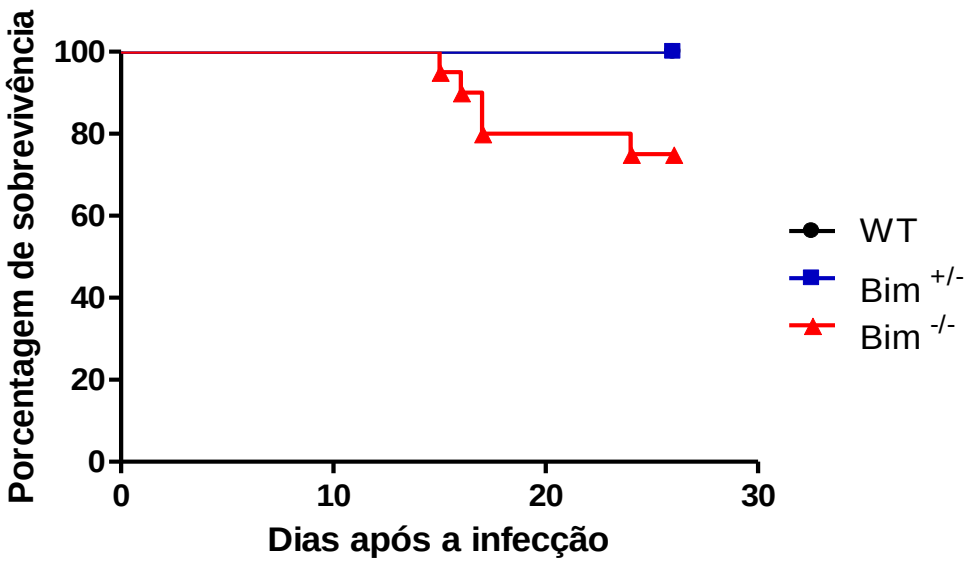

Figura 7 - Curva de mortalidade em animais *Bim*$^{-/-}$ desafiados com *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram inoculados i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. A mortalidade foi acompanhada diariamente durante 26 dias. Os resultados representam a somatória de 3 experimentos independentes, (n=20 para os grupos *Bim*$^{+/+}$ e *Bim*$^{-/-}$ e n=10 para os animais *Bim*$^{+/-}$). Curva de Kaplan-Meier (teste de Log-Rank).

4.2 Falha no desenvolvimento vaginal em fêmeas *Bim*$^{-/-}$ não é responsável da mortalidade exibida no modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi*

Através de avaliação física dos animais Bim$^{-/-}$ foi observado inchaço na região perianal e distensão da vagina e do útero devido ao acúmulo do fluido produzido durante o ciclo estral, além da ocorrência de células epiteliais desprendidas. A maioria dos camundongos mostraram uma progressão do edema, que tornou-se mais evidente aos 2 meses de idade e estando presente, em maior ou menor grau, em aproximadamente 90% das fêmeas.

A fim de eliminar as suspeitas de que estas fêmeas estariam apresentando algum tipo de infecção nesta região, que pudesse interferir no desenvolvimento da infecção experimental pelo *T. cruzi*, duas fêmeas *Bim*$^{-/-}$, de 14 semanas de idade com inchaço perianal notório e definido foram enviadas para o Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, para análise bacteriológica. Segundo os resultados enviados pela bióloga Simone Lira da Cruz (CRBio 074172/01-D) com número de protocolo 1150, os animais foram negativos para todos os agentes bacterianos avaliados (Tabela II). Dessa forma, sugerimos que a mortalidade observada nesses animais não está relacionada a uma possível infecção bacteriana fruto de uma má formação embriológica na região vaginal/perianal das fêmeas *Bim*$^{-/-}$.

MICRORGANISMOS	RESULTADOS	LABORATÓRIO	MÉTODO
Citrobacter freundii	Negativo	LCSA – ICB	Cultura
Pasteurella pneumotropica	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Pasteurella multocida	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Salmonella spp	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Streptobacillus moniliformis	Negativo	LCSA – ICB	Exame físico + cultura
Streptococcus β hemolítico	Negativo	LCSA – ICB	Cultura
Streptococcus pneumoniae	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Staphylococcus aureus	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Pseudomonas aeruginosa	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Klebsiella pneumoniae	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Proteus mirabilis (Intestino)	Negativo	LCSA – ICB	Idem
Proteus mirabilis (Pulmão)	Negativo	LCSA – ICB	Idem

Outros microrganismos isolados: *Escherichia coli, Micrococcus spp e Enterococcus faecalis*

Tabela II- Análise bacteriológica de camundongos *Bim*$^{-/-}$. Amostras de fezes do jejuno, ceco e intestino grosso, bem como amostras de orofaringe foram coletadas de 2 fêmeas *Bim*$^{-/-}$ de 14 semanas de idade com inchaço perianal notório e definido. As amostras foram semeadas em meios seletivos e incubadas por 24-48 horas a 37 °C, em aerobiose e anaerobiose. A identificação das bactérias foi feita pelo sistema EPM-MILi (PROBAC), Bactray 1,2 e 3 e BBL Crystal (LABORCLIN).

Ademais, não observamos nenhuma correlação entre a susceptibilidade dos camundongos *Bim*$^{-/-}$ e níveis de má-formação da vagina (dados não mostrados).

4.3 Macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos *Bim*$^{-/-}$ são deficientes na produção de NO no pico da parasitemia

A fim de avaliar o papel da proteína Bim no controle e eliminação do *T. cruzi* nós iniciamos nossos estudos investigando, no pico da parasitemia dos camundongos *Bim*$^{-/-}$, a capacidade dos macrófagos peritoneais de produzir oxido nítrico, uma vez que a produção de NO está relacionada à resistência ao parasita, e o peritônio representa a via de inoculação em nosso modelo experimental. Assim, sobrenadantes de cultura de células obtidas do lavado peritoneal de camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$, previamente infectados ou não com *T. cruzi* foram incubadas durante 48 h. Após o período de incubação, a concentração de NO foi determinada pela reação de Griess. Interessantemente, como pode-se observar na Figura 8, as células de animais deficientes da proteína Bim mostraram uma diminuição estatisticamente significativa na liberação de oxido nítrico quando comparados com os grupos controle, o que poderia explicar os altos níveis de parasitas no sangue dos animais *Bim*$^{-/-}$ no dia 9 após a infecção.

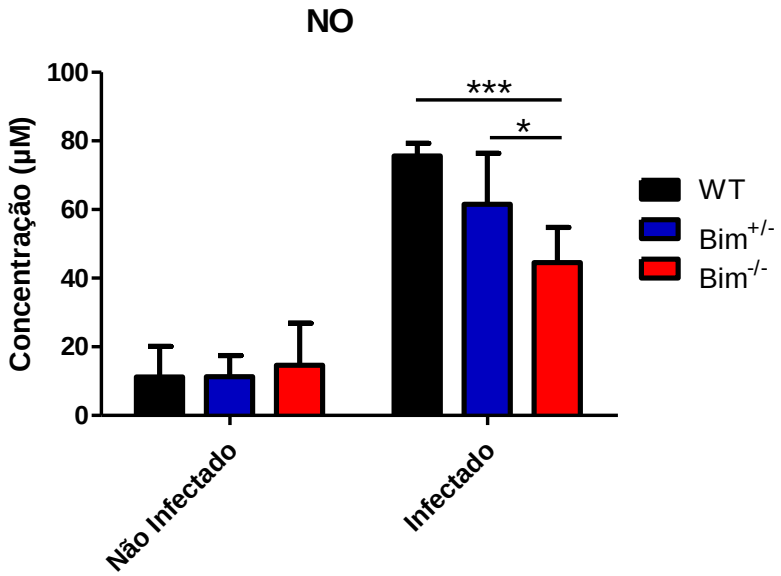

Figura 8 - Macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos *Bim*$^{-/-}$ são deficientes na produção de NO no pico da parasitemia. Sobrenadantes da cultura de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$ previamente inoculados (9 dias antes) ou não com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, foram coletados após 48 h de incubação *in vitro*. A concentração de oxido nítrico (NO) foi determinada pela reação de Griess, através da quantificação de nitrito no sobrenadante da cultura celular. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de 5 animais para o grupo de animais infectados e n=3 para o grupo de animais não infectados. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * (p>0,05), ***(p>0,001)

4.4 Macrófagos *Bim*$^{-/-}$ não apresentam defeito intrínseco frente à infecção com *T. cruzi*

Uma vez que os macrófagos isolados de camundongos *Bim*$^{-/-}$ no pico de sua parasitemia apresentaram uma deficiência na produção de NO, nos consideramos a possibilidade de que estes macrófagos tenham um defeito intrínseco em sua função efetora frente ao parasita. Assim, com o intuito de avaliar esta hipótese, macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos naïve C57BL/6 *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram infectados *in vitro* com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* por 2 h. Após o período de infecção, os parasitas extracelulares foram removidos e as culturas receberam ou não IFN-γ recombinante na concentração 10 ng/mL. Após 48 h, os macrófagos foram fixados com metanol e corados com o marcador fluorescente DAPI que se liga fortemente a regiões enriquecidas em adenina e timina, permitindo a identificação do núcleo tanto dos macrófagos como das formas amastigotas intracelulares (Figura 9A). Após a infecção, tanto animais *Bim*$^{+/-}$ como *Bim*$^{-/-}$ mostraram a mesma porcentagem de macrófagos infectados de aproximadamente 50%, com uma media de 150 formas amastigotas para cada 100 macrófagos. Além disto, o tratamento com IFN-γ ativou os macrófagos de maneira similar, diminuindo a porcentagem de macrófagos infectados nos dois grupos (Figura 9B-C). Também não houve diferenças significativas quanto à produção de NO pelos macrófagos obtidos de camundongos *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ (Figura 9D). Em conjunto, nossos resultados indicam que os macrófagos *Bim*$^{-/-}$ não apresentam uma deficiência intrínseca no que se refere à sua ativação e capacidade microbicida frente ao *T. cruzi*. Portanto, é possível que a deficiência na produção de NO observada em células da cavidade peritoneal dos camundongos *Bim*$^{-/-}$, no pico da parasitemia, esteja relacionada a uma diferença na composição das subpopulações de macrófagos nestes animais.

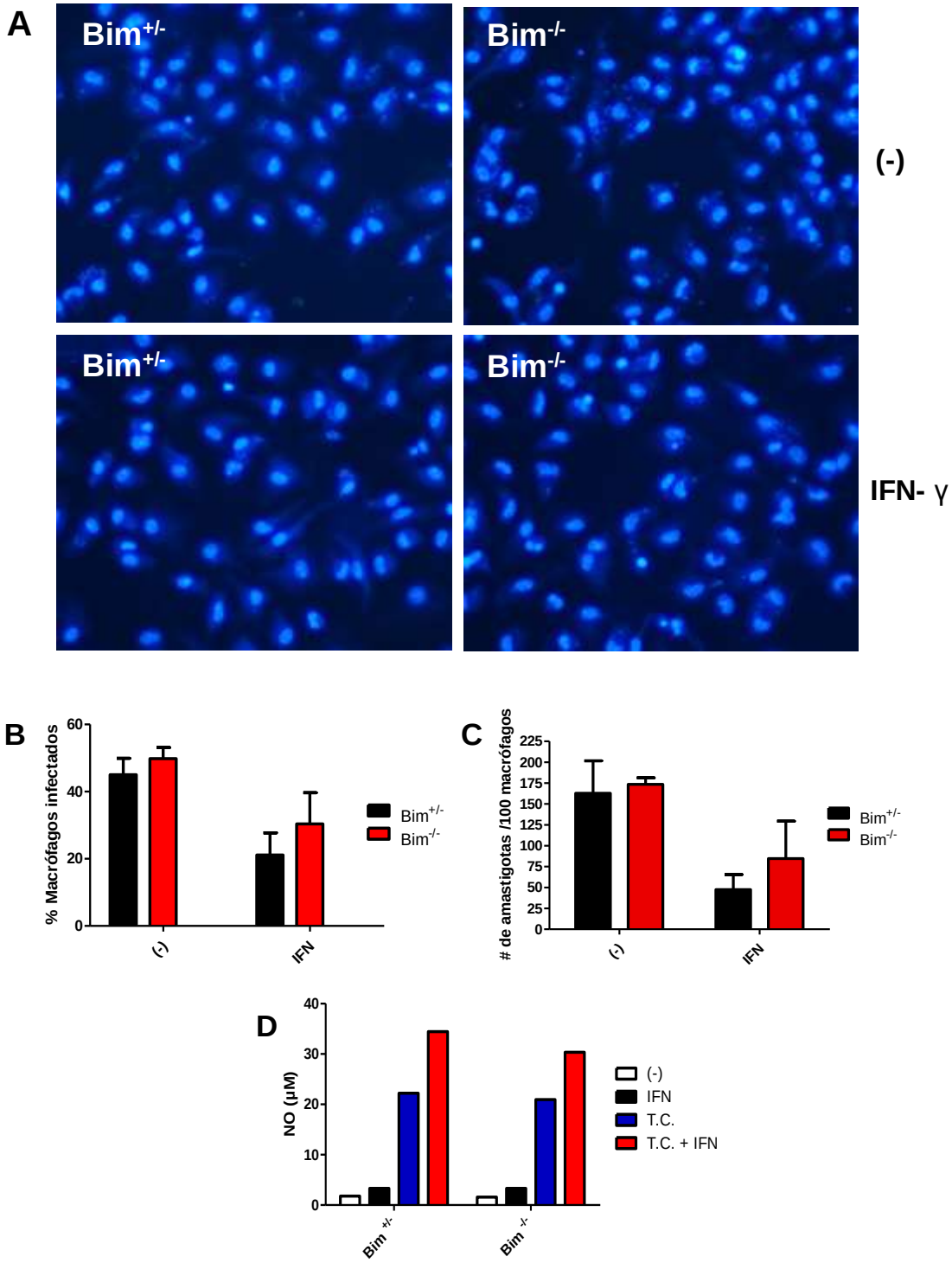

Figura 9 - Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais com *T. cruzi.* Macrófagos da cavidade peritoneal (3 x 10^5 células por poço para a avaliação da infecção e 1x10^6 células por poço para a detecção de oxido nítrico) de camundongos C57BL/6 Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$ foram infectados *in vitro* com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* (5 parasitas/cel) por 2 h. Após o período de infecção, os parasitas extracelulares foram removidos e foi adicionado ou não IFN-*γ* recombinante na concentração 10 ng/mL. **A-C)** Após 48 h, os macrófagos foram fixados com metanol e marcados com DAPI. A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por cada 100 macrófagos foram avaliados por microscopia de fluorescência sob objetiva de 40 x. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de amostras em triplicata. **D)** Após 48 h da infecção, a concentração de oxido nítrico (NO) foi determinada pela reação de Griess, através da quantificação de nitrito no sobrenadante da cultura celular. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni**.**

4.5. A cavidade peritoneal de animais Bim$^{-/-}$ apresenta uma porcentagem reduzida da população SPM no pico da parasitemia

A fim de caracterizar as populações de macrófagos F4/80^{+} presentes na cavidade peritoneal dos nossos grupos experimentais, 1 x 10^{6} células obtidas da lavagem do peritônio de animais *Bim*$^{+/+}$*, Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$, previamente inoculados ou não com 1 x 10^{4} formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi,* foram incubados com 25 µL da solução dos anticorpos monoclonais para CD19, CD11c, F4/80 e MHC-II. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo e a estratégia de *gate* utilizada foi a seguinte: FSC-A x FSC-H para excluir *doublets*, CD19 x FSC-H para excluir linfócitos B, CD11c x FSC-A para excluir células dendríticas, F4/80 x SSC-A para selecionar a população de macrófagos F4/80^{+} e F4/80 x MHC-II para determinar as populações de macrófagos no peritônio, SPM (*Small peritoneal macrophage*) e LPM (*Large peritoneal macrophage*) (Figura 10A). A população SPM foi identificada pela expressão de F4/80^{low} e MHC-II^{high} e a população LPM pela expressão de F4/80^{high} e MHC-II^{low}. Como esperado, o grupo de animais selvagens não imunizados apresentou uma predominância de células LPM em relação à população SPM. Interessantemente, não houve diferenças significativas entre os grupos de animais *Bim*$^{+/+}$*, Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$*.* Novamente, como esperado, nos camundongos imunizados, a distribuição das populações foi invertida, predominando os macrófagos SPM. No entanto, desta vez, o grupo de animais *Bim*$^{-/-}$ mostrou uma porcentagem reduzida da população SPM, quando comparada aos grupos controles (Figura 10B). Não houve diferença significativa em relação à população de macrófagos LPM (Figura 10C), que praticamente desapareceu nos três grupos, após o estimulo com o parasita.

Nossos resultados sugerem que camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma falha no influxo celular para o sitio de infecção, e que esta falha se reflete em um menor aporte de células inflamatórias para este local, o que poderia explicar a produção diminuída de NO, o que poderia contribuir para a maior parasitemia observada nestes animais.

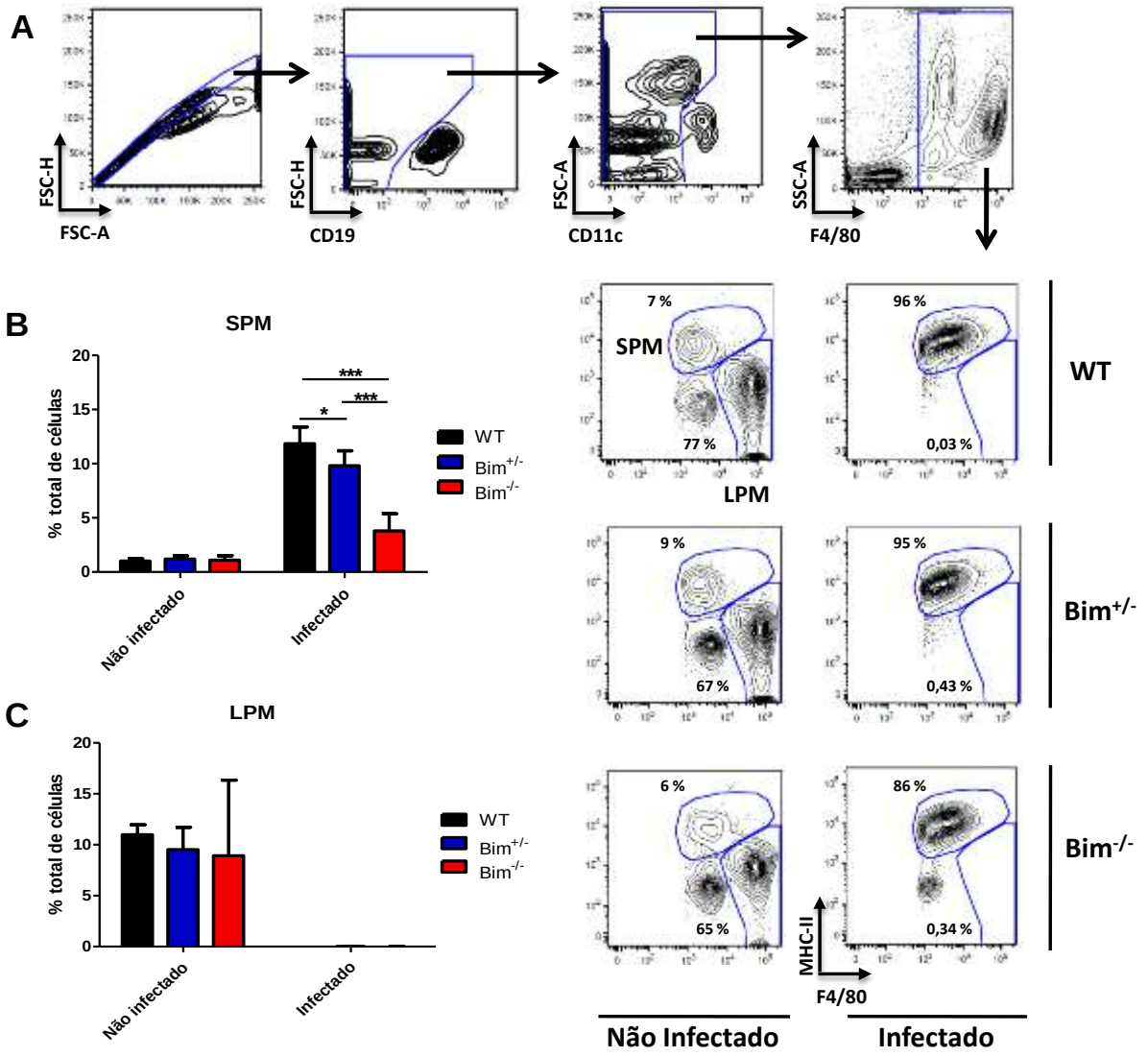

Figura 10 - A cavidade peritoneal de animais Bim$^{-/-}$ tem uma porcentagem reduzida da população SPM no pico da parasitemia. Células da cavidade peritoneal (1 x 10^6 celulas) de camundongos C57BL/6 Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$ previamente inoculados ou não (9 dias atrás) com 1x10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi,* foram incubados com 25 µL da solução dos anticorpos monoclonais para CD19, CD11c, F4/80 e MHC-II. Após 30 minutos, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído 1%. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo. **A)** A estratégia de *gate* utilizada foi a seguinte: FSC-A x FSC-H para excluir *doublets*, CD19 x FSC-H para excluir Linfócitos B, CD11c x FSC-A para excluir células dendríticas, F4/80 x SSC-A para selecionar a população de macrófagos F4/80+ e F4/80 x MHC-II para determinar as populações de macrófagos no peritônio, SPM (*Small peritoneal macrophage*) e LPM (*Large peritoneal macrophage*). **B-C)** Gráficos representativos da porcentagem de células SPM e LPM em relação à quantidade total de células peritoneais. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de 5 animais para o grupo de animais infectados e n=3 para o grupo de animais não infectados. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * (p>0,05), ***(p>0,001)

4.6. Esplenócitos de camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiência na produção de NO, IFN-γ e IL-6 na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*

Continuando com nossa investigação sobre possíveis mecanismos que contribuem para a sensibilidade à infecção com o *T. cruzi*, observada em camundongos *Bim*$^{-/-}$, nós avaliamos a produção de oxido nítrico e das citocinas IFN-γ e IL-6 nos sobrenadantes da cultura de esplenócitos obtidos de camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$, previamente inoculados ou não por 9 dias, com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi.* Após 48 horas da incubação, a concentração de NO foi determinada pela reação de Griess, através da quantificação de nitrito no sobrenadante da cultura celular. Interessantemente, nossos resultados mostraram novamente uma diminuição estatisticamente significativa da produção desta molécula nos camundongos *Bim*$^{-/-}$, quando comparados com os grupos controle (Figura 11A). Os níveis de IFN-γ e IL-6 foram determinados 48 h e 24 h respectivamente após a incubação, através de um ELISA de captura. Como pode-se observar na Figura 11B-C, assim como descrito anteriormente, os esplenócitos de camundongos *Bim*$^{-/-}$ também se mostraram deficientes na liberação destas duas citocinas. A deficiência na produção de NO, IFN-γ e IL-6 pelos esplenócitos também pode estar contribuindo para o estabelecimento da alta carga parasitaria observada nos animais *Bim*$^{-/-}$ no dia 9 após a infecção.

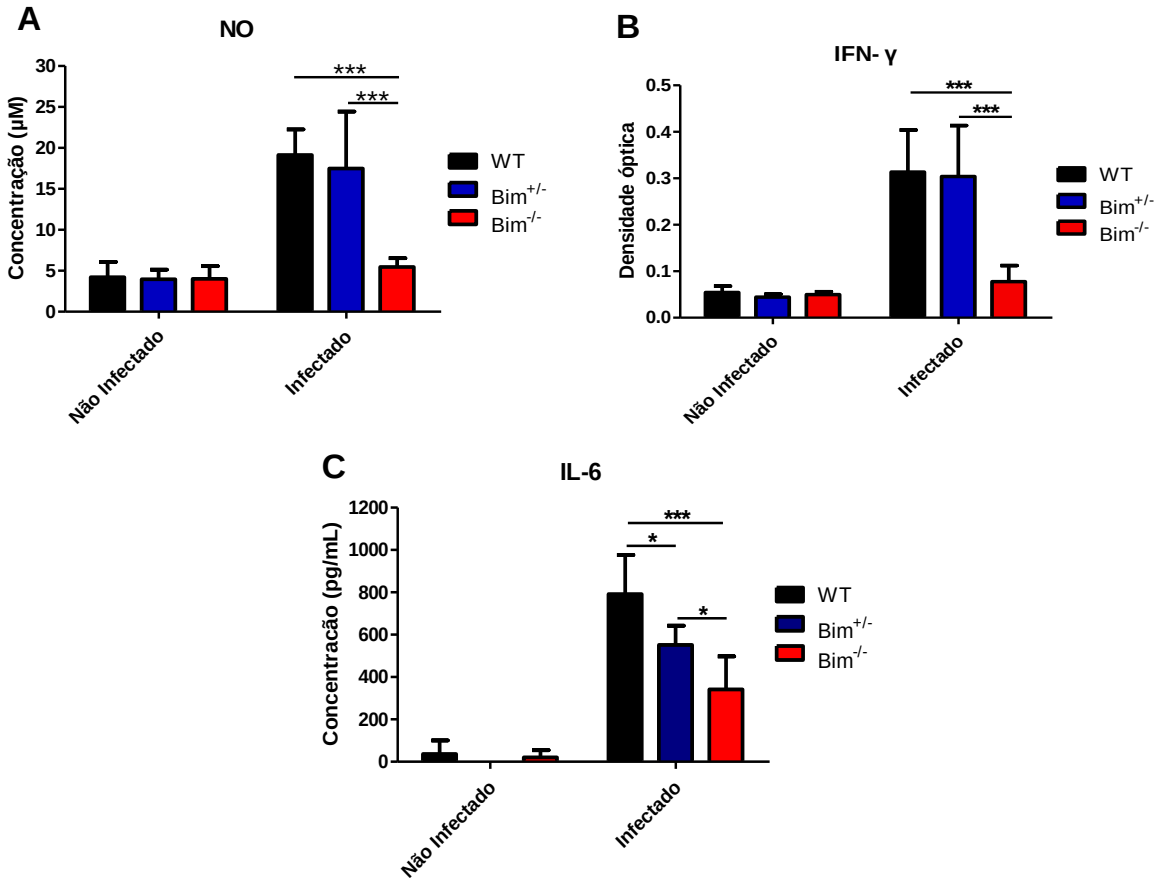

Figura 11 - Camundongos *Bim*$^{-/-}$ são deficientes na produção de NO, IFN-γ e IL-6 no pico da parasitemia. Sobrenadantes da cultura de esplenócitos de camundongos C57BL/6 Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$ previamente inoculados (9 dias antes) ou não com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi,* foram coletados após 24 h (IL-6) e 48 h (NO, IFN- γ) de incubação. **A)** A concentração de oxido nítrico (NO) foi determinada pela reação de Griess, através da quantificação de nitrito no sobrenadante da cultura celular. **B)** A densidade óptica foi determinada através de um ELISA de captura. **C)** A concentração de IL-6 foi determinada através de um ELISA de captura. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de 5 animais para o grupo de animais infectados e n=3 para o grupo de animais não infectados. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * (p>0,05), ***(p>0,001)

4.7. Camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiência no desenvolvimento da resposta mediada por linfócitos TCD8^{+} antígeno-específicos ao *T. cruzi*

É sabido que células T CD8^{+} antígeno-específicas são fundamentais no controle da infecção pelo *T. cruzi*, principalmente através da produção de IFN-γ, perforina e a atividade citotóxica contra células do hospedeiro infectadas pelo parasita. Uma vez observado que camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentaram defeitos na produção de IFN-γ pelos esplenócitos, nós decidimos investigar o compartimento de células T CD8^{+} nestes animais, após a infecção pelo *T. cruzi*. Assim, realizamos o ensaio de citotoxicidade *in vivo*, nove dias após a infecção, o que corresponde ao pico da parasitemia dos animais *Bim*$^{-/-}$ e à fase de regressão da parasitemia em animais selvagens e *Bim*$^{+/-}$ (Figura 6). Para tanto, infectamos os diferentes grupos de animais e inoculamos as células-alvo no dia 8 de infecção, conforme descrito em Materiais e Métodos. Nossos resultados indicam que camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiência na eliminação de células-alvo pulsadas com o peptídeo dominante PA8, uma vez que um número significativamente maior de células *CellTrace*^{high} e *CellTrace*^{low} foram detectadas nestes animais, quando comparado ao grupo de animais controle (Figura 12). Em comparação, todos os animais foram capazes de eliminar as células-alvo pulsadas com o peptídeo sub-dominante TsKb18 com a mesma eficiência (*CFSE*^{high}). Deste modo, nossos resultados indicam que, no modelo de infecção aguda pelo *T. cruzi*, a proteína Bim é importante para o desenvolvimento adequado de uma resposta antígeno-específica mediada pelos linfócitos T CD8^{+}.

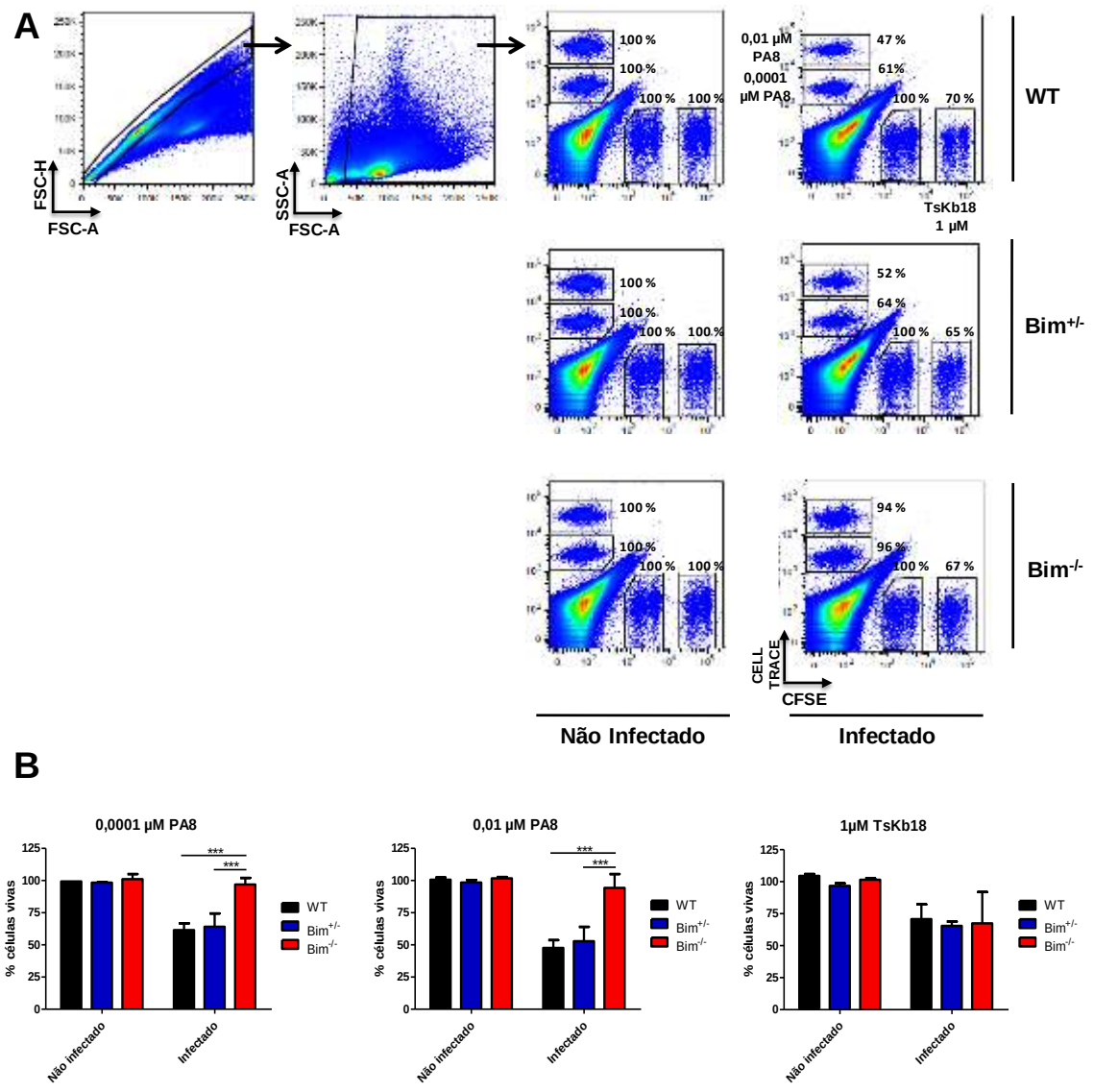

Figura 12 - Camundongos Bim$^{-/-}$ são deficientes na eliminação de células alvo pulsadas com o peptídeo PA8 no pico da parasitemia. A) Camundongos C57BL/6 *Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$* e *Bim$^{-/-}$* foram inoculados ou não i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi.* **A)** Após 9 dias da infecção (pico da parasitemia dos animais Bim$^{-/-}$) os animais foram inoculados com 40x10^6 esplenócitos divididos em 4 populações marcadas com 1 µM de CFSE (não pulsadas), 10 µM de CFSE (pulsadas com 1 µM do peptídeo TsKb18), 1 µM de CellTrace violet (pulsadas com 0,0001 µM do peptídeo PA8) e 10 µM de Cell trace (pulsadas com 0,01 µM do peptídeo PA8). Após 16-20 horas da transferência, a lise específica das células alvo foi determinada por citometria de fluxo. **B)** Gráficos representativos das células-alvo vivas transferidas nos animais *Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de 5 animais para* o grupo de animais infectados e n=3 para o grupo não infectado. Resultados representativos de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. ***(p>0,001)

Continuando com nossa análise da resposta de linfócitos T CD8$^+$, nós avaliamos, neste mesmo período, a frequência de células produtoras de IFN-γ pela técnica de ELISPOT. Como podemos observar, todos os animais infectados apresentaram uma frequência basal levemente aumentada de células produtoras de IFN-γ (Figura 13A, painel superior; e Figura 13B). Por outro lado, a frequência de células produtoras de IFN-γ de camundongos *Bim*$^{-/-}$, em resposta ao estímulo com o peptídeo PA8, foi menor do que a observada camundongos *Bim*$^{+/+}$ e *Bim*$^{+/-}$, os quais responderam significativamente mais ao estimulo (Figura 13A-B). Portanto, camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiência também na frequência de células produtoras de IFN-γ, no pico da sua parasitemia, quando comparado aos animais *Bim*$^{+/+}$ e *Bim*$^{+/-}$.

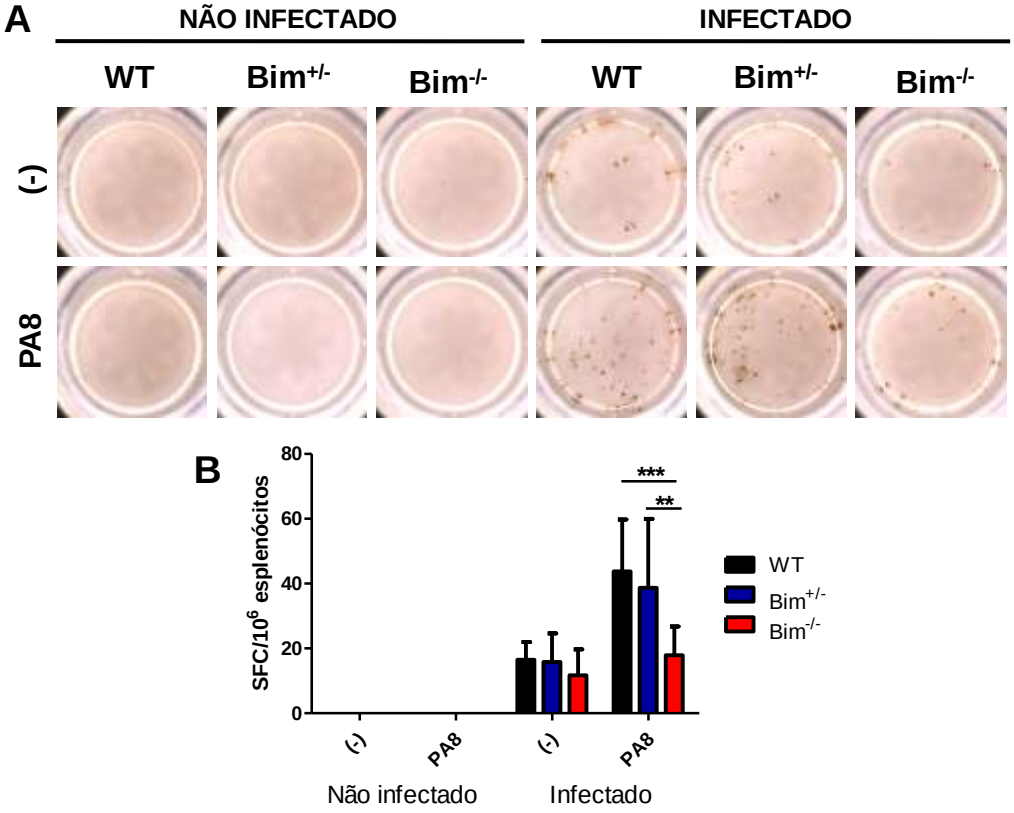

Figura 13 - Ensaio de ELISPOT para determinar a frequência de células produtoras de IFN-*γ* no pico da parasitemia dos camundongos Bim$^{-/-}$. Camundongos C57BL/6 Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$ foram inoculados ou não i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi.* **A)** Após 9 dias da infecção (pico da parasitemia dos animais Bim$^{-/-}$), a frequência de células produtoras de IFN-*γ* foi determinada *ex vivo* na presença do peptídeo PA8. **B)** Gráfico representativo do número de células produtoras de IFN-*γ* de animais Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de 5 animais para o grupo de animais infectados e n=3 para o grupo não infectado. Resultados representativos de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. SFC (células formadoras de pontos).

Neste sentido, o fato de que o pico de parasitemia é maior e mais atrasado em camundongos *Bim*$^{-/-}$, poderia ser resultado de uma falha ou de um atraso no desenvolvimento da resposta antígeno-específica mediada por linfócitos TCD8^{+}. Uma vez que a maioria dos animais *Bim*$^{-/-}$ acabam controlando a parasitemia, pelo menos temporariamente, passamos a investigar a função citotóxica e a frequência de células TCD8^{+} entre os dias 14-16 após a infecção, justamente quando alguns camundongos *Bim*$^{-/-}$ perdem o controle novamente da parasitemia e acabam entrando em óbito (Figuras 6 e 7).

Para tanto, ensaios de citotoxicidade *in vivo* foram realizados em camundongos *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ 14-15 dias após a infecção com 1x10^{4} formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Para nossa surpresa, desta vez, camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentaram capacidade similar aos controles selvagens e *Bim*$^{+/-}$, no que se refere à eliminação de alvos pulsados com as duas concentrações testadas do peptídeo imunodominante PA8 (Figura 14). Em relação ao peptídeo subdominante TsKb18, como esperado, nenhum animal conseguiu eliminar com as células alvo com a mesma eficiência observada para o peptídeo PA8, mas, novamente, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Nossos resultados sugerem que, embora os camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentem uma deficiência no desenvolvimento de uma resposta citotóxica adequada, por volta do 9º dia de infecção, esta resposta é recuperada ao redor do dia 14-15.

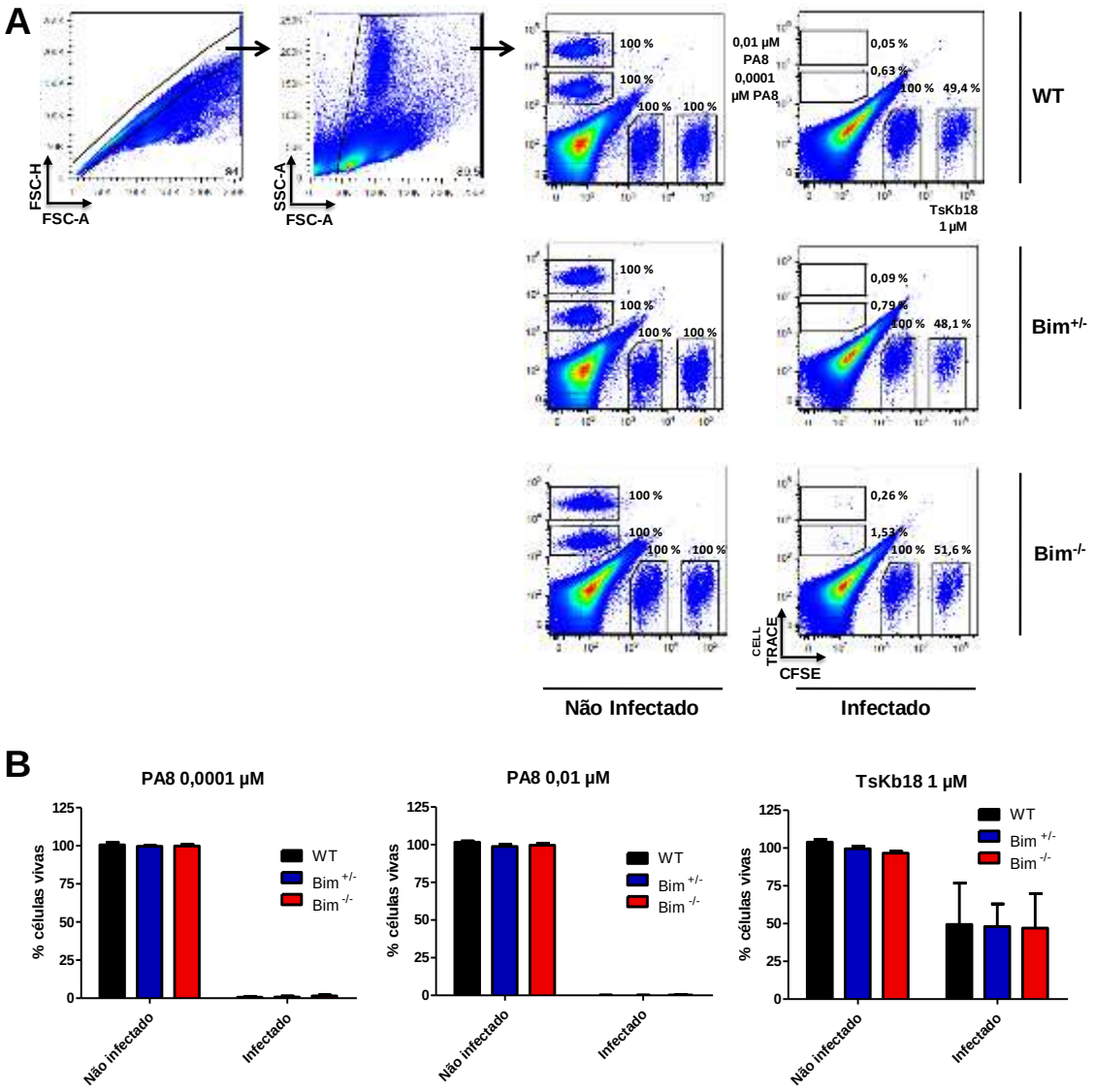

Figura 14 - Ensaio de citotoxicidade *in vivo* na fase de regressão da parasitemia. A) Camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram inoculados ou não i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi.* **A)** Após 14-15 dias da infecção (na fase de regressão da parasitemia dos animais controles) os animais foram inoculados com 4x10^7 esplenócitos divididos em 4 populações marcadas com 1 µM de CFSE (não pulsadas), 10 µM de CFSE (pulsadas com 1 µM do peptídeo TsKb18), 1 µM de CellTrace violet (pulsadas com 0,0001 µM do peptídeo PA8) e 10µM de Cell trace (pulsadas com 0,01 µM do peptídeo PA8). Após 16-20 horas da transferência, a lise específica das células alvo foi determinada por citometria de fluxo. **B)** Gráficos representativos das células-alvo vivas transferidas nos animais *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de 5 animais para o grupo de animais infectados e n=4 para o grupo não infectado. Resultados representativos de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Embora estes resultados tenham sugerido que o descontrole secundário da parasitemia e a mortalidade observada nos camundongos *Bim*$^{-/-}$ não estejam associados a uma deficiência na função efetora dos linfócitos T CD8^{+}, neste período, decidimos avaliar a frequência de células TCD8^{+} produtoras de IFN-γ, uma vez que esta citocina também é considerada importante para à infecção pelo *T. cruzi*. Nossos resultados demonstram que camundongos selvagens, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ infectados com 1 x 10^{4} formas tripomastigotas de *T. cruzi* continuam a apresentar um pequeno nível basal de produção de IFN-γ ao redor do dia 15, quando comparados a controles não infectados, como pode ser visto no painel superior da Figura 15A e na Figura 15B. Nos poços em que houve o reestimulo das células com o peptídeo PA8 na concentração 10 μM (painel inferior da Figura 15A e Figura 15B), as células produtoras de IFN-γ dos animais WT, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ responderam positivamente e de maneira similar ao estimulo, aumentando a frequência de células produtoras desta citocina. Portanto, estes resultados sugerem que, ao contrário da susceptibilidade observada no pico da parasitemia (9º dia de infecção) dos camundongos *Bim*$^{-/-}$, a susceptibilidade destes animais ao final da fase aguda (ao redor do 14º dia de infecção), caracterizada pelo aparecimento de um segundo “pico” de parasitemia e óbito de alguns animais, não é devido a uma deficiência na atividade citotóxica ou uma diminuição no número de células T CD8^{+} produtoras de IFN-γ.

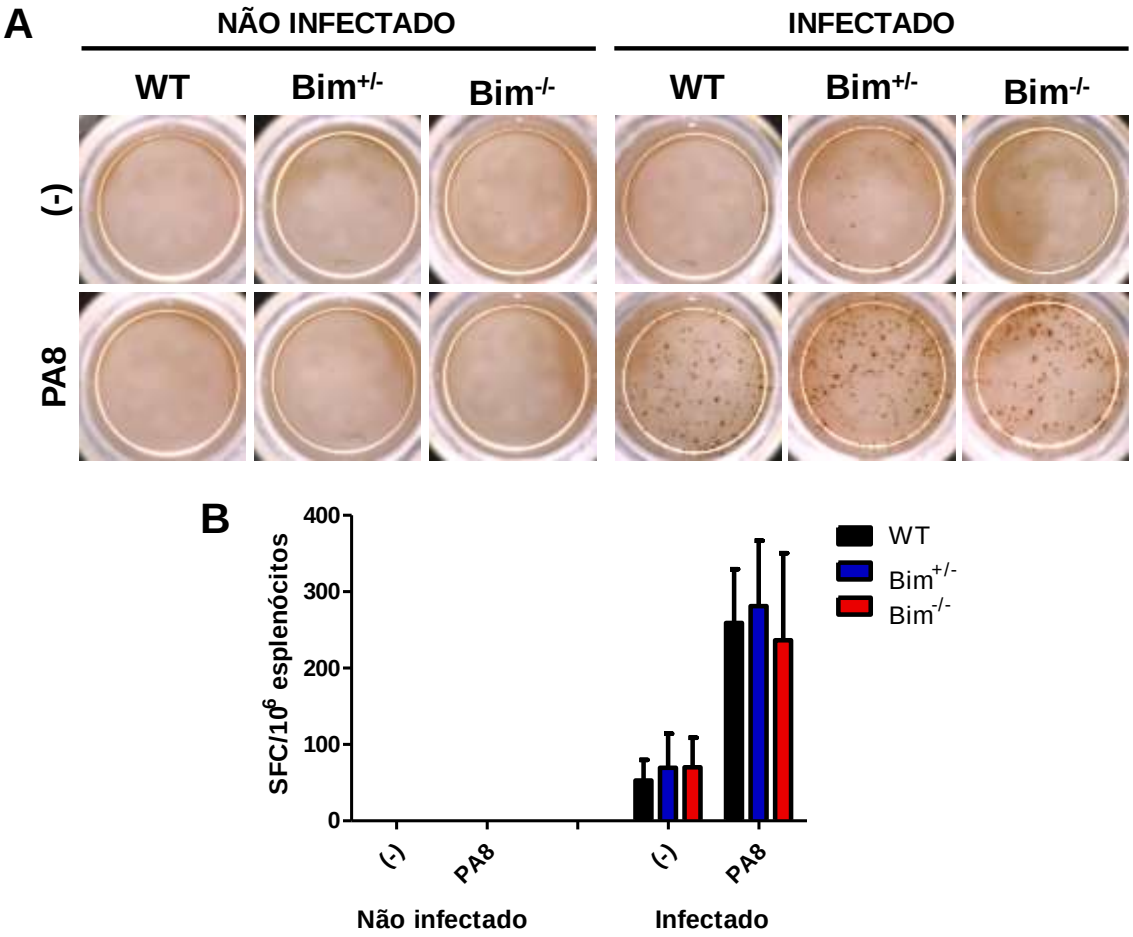

Figura 15 - Ensaio de ELISPOT para determinar a frequência de células produtoras de IFN-γ na fase de regressão da parasitemia. Camundongos C57BL/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram inoculados ou não i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi.* **A)** Após 14-15 dias da infecção (na fase de regressão da parasitemia dos animais controles), a frequência de células produtoras de IFN-γ foi determinada *ex vivo* na presença do peptídeo PA8. **B)** Gráfico representativo do número de células produtoras de IFN-γ de animais *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$. Os resultados são expressos como a média e o desvio padrão de 5 animais para o grupo de animais infectados e n=4 para o grupo não infectado. Resultados representativos de 2 experimentos independentes. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. SFC (células formadoras de pontos).

4.8 Papel das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG2a na fase da regressão da parasitemia

A imunidade humoral é um dos principais mecanismos de defesa no controle da infecção pelo *T. cruzi*. Sabe-se que estes anticorpos são importantes na eliminação do parasita já que facilitam a lise de formas tripomastigotas extracelulares e a fagocitose de parasitas opsonizados. Assim, com o objetivo de avaliar a importância das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG2a na susceptibilidade a infecção pelo *T. cruzi*, inicialmente nós comparamos a produção total destes anticorpos conforme ao reportado na literatura através de um ELISA de captura.

Como ilustrado na Figura 16, nós observamos um aumento na produção de IgM total em camundongos *knockouts* para a proteína Bim em relação aos grupos controles (3 vezes maior que os animais WT e 2 vezes maior que os animais *Bim*$^{+/-}$. Igualmente, mas em menor proporção, camundongos *Bim*$^{+/-}$ apresentaram um aumento estatisticamente significativo com relação ao grupo WT. Paralelamente, a secreção das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a foi significativamente maior nos animais *Bim*$^{-/-}$.

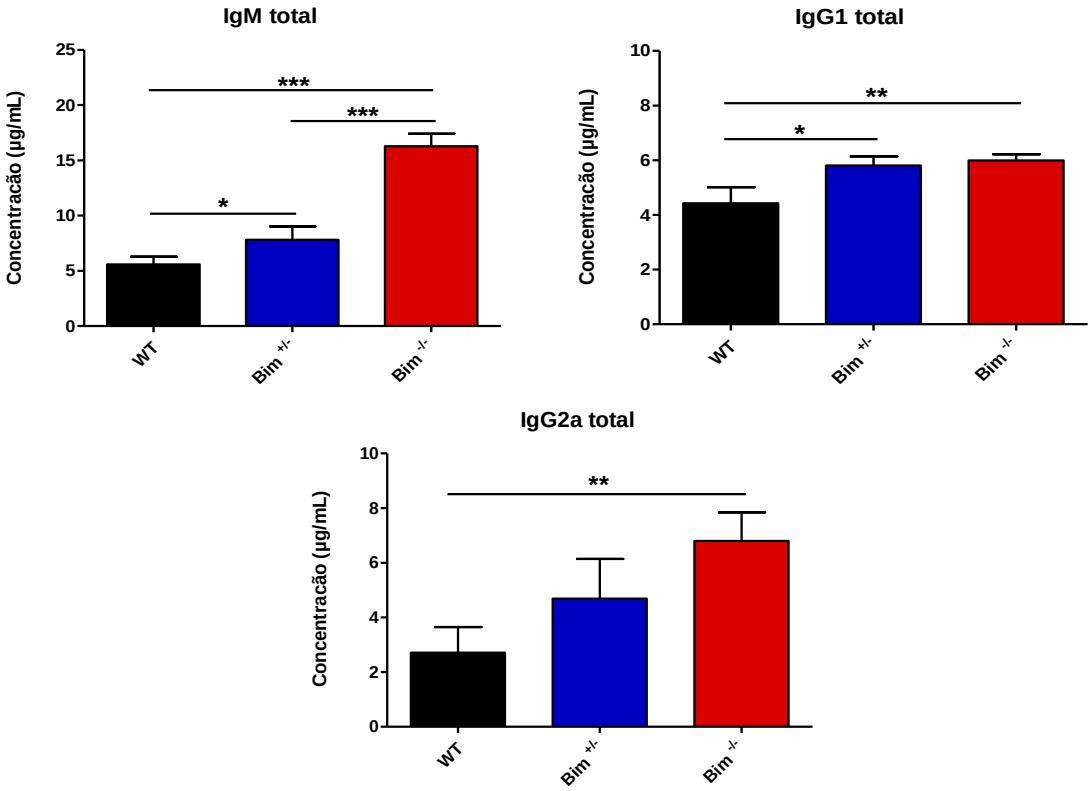

Figura 16 - Produção total dos anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a em animais *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$. O soro de camundongos C57Bl/6 *Bim*$^{+/+}$, *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foi coletado e realizado um ELISA de captura para determinar a concentração das imunoglobulinas. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e correspondem a média e desvio padrão de 4 animais para cada grupo experimental. Para a análise estatística foi utilizado o teste One- way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. *(p<0,05), **(p<0,01), ***(p<0,001)

Após verificar a produção total dos anticorpos, camundongos C57Bl/6 Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e *Bim*$^{-/-}$ foram inoculados i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi.* 0, 7, 10, 20, 30 e 60 dias após infecção foi detectada a secreção de IgM, IgG1 e IgG2 especifica para *T. cruzi*, através de um ELISA indireto. Em relação ao desenvolvimento de uma resposta imune humoral específica, nossos resultados mostram uma relação tempo-dependente na produção de cada imunoglobulina.

Assim, após o desafio inicial, animais WT e *Bim*$^{+/-}$ apresentaram uma baixa produção de IgM que é mantida tanto na fase aguda (Figura 17) como na fase crônica da infecção (dados não mostrados). Entretanto, camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma alta secreção do anticorpo (4 vezes maior que os controles) na primeira fase após o desafio, atingindo um pico de secreção no dia 20 após a infecção (Figura 17) e diminuindo conforme a progressão da doença (dados não mostrados). Por outro lado, na resposta específica mediada por IgG, como pode se observar na figura 17, animais *Bim*$^{-/-}$ apresentaram um padrão similar de produção em relação aos grupos controles WT e *Bim*$^{+/-}$ nos primeiros dias da infecção. Desta maneira, nossos resultados mostram que a susceptibilidade dos animais *Bim*$^{-/-}$ não é devida a uma deficiência na produção de imunoglobulinas totais ou especificas para o *T. cruzi* na fase aguda da infecção.

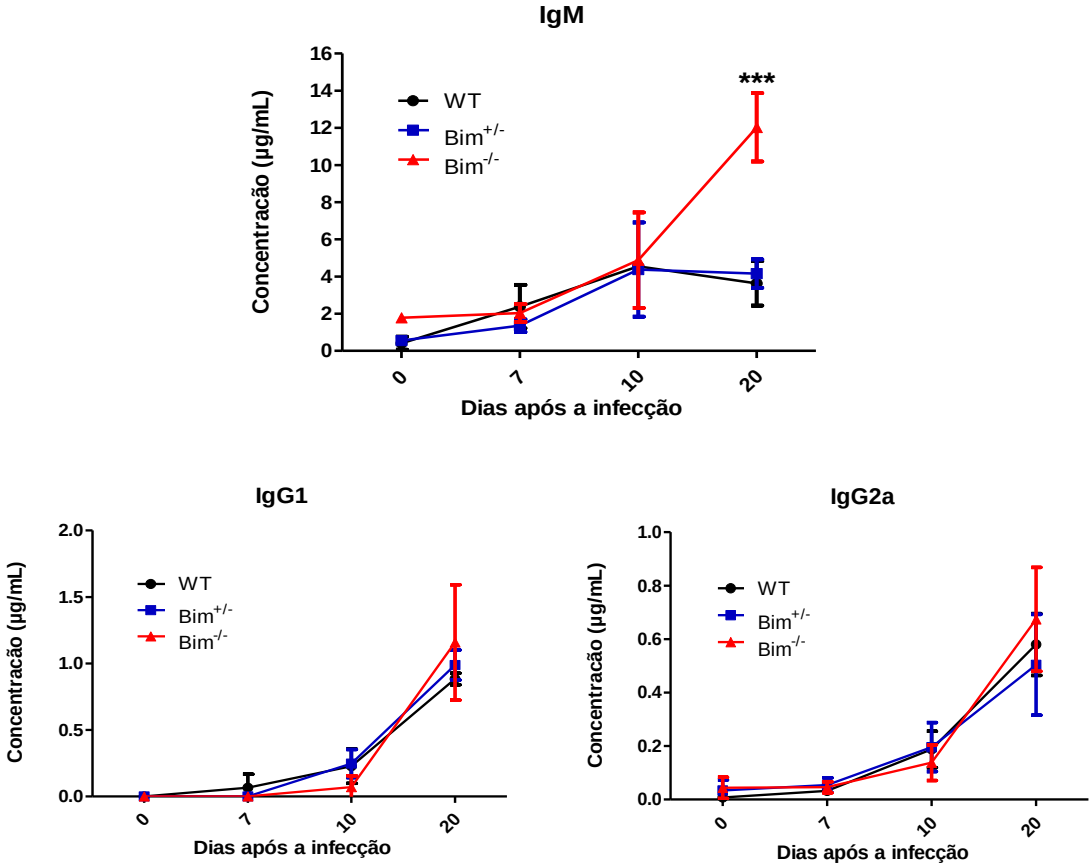

Figura 17 - Cinética da produção das imunoglobulinas IgM, IgG1 e IgG2a específicas para o *T. cruzi* na fase aguda da infecção. Camundongos C57Bl/6 Bim$^{+/+}$, Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$ foram inoculados i.p. com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi.* 0, 7, 10 e 20 dias após infecção, o soro de cada camundongo foi coletado e foi realizado um ELISA indireto para determinar a concentração dos anticorpos. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes e correspondem a média e desvio padrão de 7 animais para os grupos Bim$^{+/-}$ e Bim$^{-/-}$ e 4 animais para o grupo Bim$^{+/+}$. Para a análise estatística foi utilizado o teste Two way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. O símbolo *** indica diferenças significativas ($p<0,001$) entre os animais Bim$^{-/-}$ e os grupos controle (WT e Bim$^{+/-}$).

Em conjunto, nossos resultados sugerem um papel importante da proteína Bim no controle da replicação e eliminação do *T. cruzi* na fase inicial da infecção neste modelo experimental murino, uma vez que na ausência do fator pró-apoptótico houve aumento da carga parasitaria e da mortalidade de animais $Bim^{-/-}$, assim como deficiência no controle do parasita pelo sistema imune. Esta deficiência foi evidenciada pela diminuição da atividade microbicida assim como um defeito no influxo de macrófagos peritoneais. De igual forma, foi obsevada uma diminuição da produção de oxido nítrico e as citocinas pró-inflamatorias IFN-γ e IL-6, e a deficiência na atividade citotóxica de linfócitos $TCD8^{+}$.

5 DISCUSSÃO

O papel da proteína Bim no controle de diversos fenômenos do sistema imune, como a seleção negativa de timócitos auto-reativos, a eliminação de linfócitos T ativados após a expansão clonal, assim como a eliminação de células B auto-reativas, entre outras funções, tem sido amplamente descrito na literatura (45,57). No que se refere ao papel desta proteína no controle de infecções, alguns trabalhos têm sugerido que a expressão de Bim contribui para a persistência da infecção de micro-organismos como *Leishmania major* (50), o vírus da coriomeningite linfocítica (52) assim como *Mycobacterium tuberculosis* (54). No entanto, não há relatos na literatura sobre o papel desta molécula no controle da replicação e eliminação do *T. cruzi*. Conseguimos encontrar apenas um único trabalho que avaliou a expressão de Bim durante a infeção com o *T. cruzi*, e que sugere que a atrofia do timo induzida na fase aguda da infecção pelo parasita, não modula os níveis de expressão desta proteína pró-apoptotica que, como mencionado anteriormente, é importante na deleção clonal de linfócitos T (58). Dessa forma, como o papel de Bim na infecção pelo *T. cruzi* permanece desconhecido, decidimos investigar como se dá o curso da infecção e a resposta imune de camundongos *Bim*$^{-/-}$.

Inicialmente, nós demonstramos que camundongos *Bim*$^{-/-}$ imunizados com 1 x 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, são susceptíveis a infecção pelo protozoário uma vez que apresentaram atraso no desenvolvimento da parasitemia, com um número máximo de parasitas no dia 9 após a infecção e deficiência no controle e redução do número de parasitas no sangue (Figura 6). Contrário a isso e conforme reportado na literatura, o grupo de animais controle apresentaram um pico da carga parasitaria no dia 7 ou 8 após o desafio inicial seguido da rápida eliminação de parasitas na corrente sanguínea (59). Interessantemente, 25% dos camundongos Bim$^{-/-}$ não conseguiram controlar a infecção, apresentando na maioria dos casos um segundo pico da carga parasitaria, que apesar de ser menor ao evidenciado no dia 9 após a infecção, levou os animais ao óbito (Figura 7). Embora a deficiência da proteína Bim não seja critica na sobrevivência de animais C57BL/6 infectados quando comparado aos animais *IFN-γ*$^{-/-}$ e *CD8*$^{-/-}$ onde a taxa de mortalidade é de 100% (59), nossos resultados sugerem um papel importante desta proteína no controle da infecção experimental pelo *T. cruzi* e desafia o observado em outras infecções, onde a proteína contribui para a persistência do patógeno.

Após a avaliação física dos animais *Bim*$^{-/-}$ foi observado inchaço na região perianal e distensão da vagina e do útero na maioria das fêmeas devido à vagina

imperfurada destes animais, que leva ao acumulo de fluidos durante o ciclo estral. Através de analise bacteriológica, nós comprovamos que estas alterações não estão interferindo no desenvolvimento da infecção experimental pelo *T. cruzi*, uma vez que os animais foram negativos para todos os agentes bacterianos avaliados (Tabela II). A vagina imperfurada é uma característica pouco comum na maioria das colônias de criação de camundongos, mas a incidência pode ser alta em linhagens de animais geneticamente modificados (60). Em camundongos *knockout* para proteínas envolvidas nas vias de morte celular, esse é um dos defeitos resultantes, dado que o desenvolvimento normal do trato vaginal requer apoptose de células da mucosa (61). Dessa forma, sugerimos que a mortalidade observada nesses animais não está relacionada a uma possível infecção bacteriana fruto de uma má formação embriológica na região vaginal/perianal das fêmeas *Bim*$^{-/-}$.

Uma vez observado que camundongos *Bim*$^{-/-}$ eram susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*, nós identificamos os possíveis mecanismos imunológicos celulares e/ou humorais deficientes nestes animais. Sabe-se que na fase inicial da infecção, moléculas efetoras como o oxido nítrico produzidas por macrófagos, células NK e DCs, são importantes no controle da replicação do parasita (10). No nosso modelo experimental, onde a cavidade peritoneal constitui a via de inoculação, nós observamos uma diminuição da secreção de NO nos sobrenadantes da cultura de células obtidas do lavado peritoneal de camundongos *Bim*$^{-/-}$ (Figura 8). O peroxinitrito e superóxido gerados após a produção de NO são essenciais para a atividade microbicida contra este microrganismo (62), portanto a deficiência na produção desta molécula poderia explicar os altos níveis de parasitas no sangue dos animais *Bim*$^{-/-}$ no dia 9 após a infecção e sugere que a proteína Bim participa na indução da secreção de NO no local da infecção. Paralelamente, nós observamos que a diminuição da secreção de NO não é devida a uma deficiência intrínseca dos macrófagos de animais *Bim*$^{-/-}$ no que se refere à sua ativação e capacidade microbicida frente ao *T. cruzi*, dado que macrófagos isolados do peritônio foram igualmente invadidos por formas tripomastigotas após a infecção *in vitro* e produziram a mesma quantidade de NO quando comparada ao grupo controle *Bim*$^{+/-}$ (Figura 9). Pelo contrário, foi observada uma distribuição diferenciada dos dois subtipos de macrófagos peritoneais recentemente descritos e classificados de acordo a sua morfologia como SPM (*small peritoneal macrophages*) e LPM (*large peritoneal macrophages*) (63). Em condições fisiológicas, LPM representa a

população mais abundante e responsável pela manutenção da cavidade peritoneal enquanto SPM constitui a minoria. Após a indução de estímulos inflamatórios ou em resposta a infecções, a composição celular do peritônio é completamente alterada, sendo SPM o subtipo predominante e a maior fonte de mediadores inflamatórios importantes para controlar a infecção, em relação à população LPM que praticamente desaparece (64). Interessantemente, nós observamos que camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentaram uma porcentagem reduzida da população SPM quando comparado ao grupo de animais *Bim*$^{+/-}$ e *Bim*$^{+/+}$ após o estimulo inicial com o parasita. (Figura 10). Tem sido demonstrado que animais infectados com *T. cruzi*, apresentam um número maior de macrófagos SPM e secretam altos níveis de NO em resposta ao LPS e IFN-γ (65). Portanto, é possível que a deficiência na atividade microbicida de células da cavidade peritoneal dos camundongos *Bim*$^{-/-}$, no pico da parasitemia, esteja relacionada a uma diferença na composição das subpopulações de macrófagos nestes animais. Esta falha poderia implicar um menor aporte de células inflamatórias para o local de infecção assim como uma produção reduzida de NO, o que poderia contribuir para a maior parasitemia observada nestes animais e sugerindo novamente a importância de Bim na resistência a infecção. Contudo, o papel dos macrófagos SPM no controle de infecções não está completamente esclarecido. Interessantemente e diferentemente dos nossos resultados, Aguiló e colaboradores mostraram que macrófagos de animais *Bim*$^{-/-}$ infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* reduziram significativamente a expressão de Bim e consequentemente inibiram a morte por apoptose destas células. Além disso, a modulação negativa de Bim diminuiu a propagação da infecção, sugerindo neste trabalho, que a proteína Bim é um fator essencial que contribui para a colonização de novas células hospedeiras pelo patógeno (54).

Neste modelo de infecção experimental, nós também demonstramos uma possível susceptibilidade dos camundongos *Bim*$^{-/-}$ dependente da produção de NO e das citocinas IFN-γ e IL-6, uma vez que esplenócitos obtidos destes animais mostraram ser deficientes na liberação destas moléculas quando comparada aos animais controle (Figura 11). Esta deficiência poderia estar contribuindo para o estabelecimento da alta carga parasitaria observada no dia 9 após a infecção. Diferentes trabalhos tem mostrado o papel central do IFN-γ na resistência à infecção contra o *T. cruzi*. Camundongos deficientes do receptor para esta citocina (21) ou tratados com anticorpos neutralizantes contra IFN-γ (20) resultam incapazes de

sobreviver após a imunização com o parasita. Simultaneamente, após a administração de IFN-γ recombinante murino, camundongos infectados com o parasita reduziram significativamente a parasitemia e a mortalidade em relação aos grupos controle (22). Por sua vez, a diminuição da produção de IFN-γ tem incidência direta na redução dos níveis de NO devido a capacidade desta citocina em ativar macrófagos que constituem a principal fonte de oxido nítrico. De maneira semelhante ao IFN-γ, tem sido descrito a importância das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio derivados do NO no controle da replicação do parasita. Camundongos tratados com inibidores da enzima óxido nítrico sintase mostraram ser altamente susceptíveis a través do aumento da parasitemia e mortalidade após a infecção com a cepa Y do *T. cruzi* (23). Assim, nós sugerimos que a deficiência da produção de IFN-γ leva a uma diminuição na produção de NO que por sua vez poderia reduzir a atividade microbicida dos macrófagos contra o parasita.

Adicionalmente, além do IFN-γ, a infecção por *T. cruzi* estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1α/β, IL-6 e TNF-α. As reações mediada por estas citocinas ajudam na eliminação dos parasitas, embora a imunopatologia desencadeada pela inflamação excessiva tenha um impacto significativo sobre a patogênese da doença de Chagas experimental (66). A IL-6 resulta importante na resistência à infecção por diferentes patógenos através da produção de proteínas da fase aguda, na montagem de uma resposta mediada por neutrófilos e linfócitos T $CD4^+$ do subtipo Th1, entre outros. Na infecção experimental pelo *T. cruzi*, animais *IL-6*$^{-/-}$ apresentam níveis três vezes maiores de carga parasitaria e morrem rapidamente quando comparado aos animais selvagem (67). Portanto, é possível que a diminuição da produção de IL-6 observada em camundongos *Bim*$^{-/-}$ seja um fator que contribui na replicação do parasita assim como do aumento da mortalidade na fase aguda da infecção.

Além disto, em nosso modelo experimental, camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentaram uma deficiência no desenvolvimento da resposta mediada por linfócitos $TCD8^+$ antígeno-específicos ao *T. cruzi*. Sabe-se que linfócitos T $CD8^+$ representam um dos mecanismos da imunidade adaptativa mais importante no controle da infecção, principalmente através da produção de IFN-γ, perforina e a atividade citotóxica contra células infectadas pelo parasita (10). Nós observamos uma diminuição na frequência de células produtoras de IFN-γ, no pico da parasitemia de animais *Bim*$^{-/-}$ quando comparado aos grupos *Bim*$^{+/+}$ e *Bim*$^{+/-}$ (Figura

13). Uma vez que linfócitos TCD8$^+$ junto com linfócitos T CD4$^+$ do subtipo Th1 representam a principal fonte desta citocina após o desenvolvimento da resposta adaptativa, a diminuição na produção total de IFN-γ observada no sobrenadante de esplenócitos em cultura poderia ser devido a uma deficiência da resposta mediada por linfócitos TCD8$^+$. Igualmente, nós identificamos um defeito na eliminação de células-alvo pulsadas com o peptídeo dominante PA8 em camundongos *Bim$^{-/-}$.* Em contrapartida, todos os animais eliminaram as células-alvo pulsadas com o peptídeo sub-dominante TsKb18 com a mesma eficiência (Figura 12). Isto devido a que na infecção experimental pelo T. cruzi, embora o repertório de possíveis epítopos seja grande, a resposta de linfócitos T CD8$^+$ é restrita a poucos, gerando forte imunodominância. No entanto, o papel deste fenômeno não esta completamente elucidado (30). Neste sentido, o atraso e o aumento do pico da parasitemia em camundongos *Bim$^{-/-}$*, poderiam ser resultado de uma falha ou de um atraso no desenvolvimento da resposta antígeno-específica mediada por linfócitos TCD8$^+$ na fase inicial da infecção. Paralelamente, não foi observada nenhuma alteração na fase de regressão da parasitemia, sugerindo que em camundongos *Bim$^{-/-}$*, esta resposta é rapidamente recuperada por volta do dia 14-15 após o desafio (Figura 14-15). Interessantemente, animais *Bim$^{-/-}$* infectados com *Leishmania major*, apresentaram maior proteção contra uma reinfecção com o parasita, através do aumento significativo na produção de IFN-γ nos linfonodos assim como do número de células T CD4$^+$ antígeno específicas produtoras de IFN-γ no local da infecção (50). Neste caso, a explicação é que a ausência de Bim promoveria um aumento da expansão de clones de linfócitos T CD4 antígeno-específicos os quais contribuiriam para uma resistência contra um segundo contato com o parasita. Embora seja possível que este fenômeno também ocorra no caso da infecção com o *T. cruzi*, nós não abordamos este aspecto em nosso estudo, uma vez que nos restringimos ao 15º dia de infecção e não avaliamos o papel de Bim em uma reinfecção.

A respeito da resposta humoral, em Camundongos *Bim$^{-/-}$*, plasmócitos aumentam de forma acelerada com a idade. Camundongos *Bim$^{-/-}$* de 6 a 12 meses de idade possuem uma produção de IgM e IgG até 3 e 10 vezes maior respectivamente quando comparado à secreção de animais WT. Em animais *Bim$^{+/-}$*, esse aumento é ligeiramente maior ao observado em animais WT (49). Conforme ao reportado por Bouillet e colaboradores, nossos resultados mostram um aumento na produção de IgM total em camundongos deficientes da proteína Bim em relação aos

grupos controles (Figura 16). Paralelamente, a secreção das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a foi significativamente maior nos animais *Bim*$^{-/-}$, porém não atingiu os níveis descritos na literatura (10 vezes maior), provavelmente devido à idade jovem dos animais no começo do experimento (8-12 semanas). Na infecção pelo *T. cruzi*, sabe-se que linfócitos B tem um papel importante, principalmente através da lise de formas tripomastigotas extracelulares e na fagocitose de parasitas opsonizados com IgGs especificas. Em camundongos C57BL/6 selvagem, na fase aguda da doença, existe uma ativação policlonal de linfócitos B, seguido do atraso no desenvolvimento da resposta humoral especifica. Assim há aumento da IgM total circulante seguida por um aumento da IgM antígeno específica. À medida que o parasita é controlado e eliminado da corrente sanguínea, as imunoglobulinas mudam de classe para uma resposta mediada por IgG total e IgG específica (38,69). Em animais *Bim*$^{-/-}$, a IgM foi 4 vezes maior no dia 20 após a infecção, que representa a fase de regressão da parasitemia nestes animais em comparação aos grupos controles, provavelmente como um mecanismo de compensação à insuficiência no controle do parasita por outros mecanismos do sistema imune. No entanto, a produção de IgG foi similar nos três grupos experimentais. Estes resultados sugerem que a susceptibilidade dos animais *Bim*$^{-/-}$ não é devida a uma deficiência na produção de imunoglobulinas totais ou especificas para o *T. cruzi* na fase aguda da infecção. (Figura 17). Em conjunto, nossos resultados sugerem um papel importante da proteína Bim no controle da infecção experimental pelo *T. cruzi* e abrem um novo panorama ao entendimento da função desta molécula no controle de infecções.

6 CONCLUSÃO

- A proteína Bim tem um papel importante no controle da infecção experimental pelo *T. cruzi*, uma vez que a ausência da molécula leva a uma deficiência no controle da carga parasitaria pelo sistema imune e diminui a taxa de sobrevida de camundongos Bim$^{-/-}$.

- Macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma diminuição da atividade microbicida contra o *T. cruzi*, evidenciado pela deficiência na produção de NO no pico da parasitemia. Esta deficiência não é devida a um defeito intrínseco em sua função efetora frente ao parasita.

- Camundongos *Bim*$^{-/-}$ tem um defeito no influxo de macrófagos para o sitio de infecção, evidenciado pela porcentagem reduzida da população SPM no pico da parasitemia.

- Esplenócitos de camundongos *Bim*$^{-/-}$ são deficientes na produção de NO, IFN-γ e IL-6 na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi.*

- Camundongos *Bim*$^{-/-}$ apresentam uma deficiência no desenvolvimento da resposta mediada por linfócitos TCD8^{+} antígeno-específicos ao *T. cruzi* no pico da parasitemia (9º dia), sendo esta resposta recuperada rapidamente ao redor do dia 14-15 após a infecção.

REFERÊNCIAS*

1. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;375(9723):1388–402.

2. Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin North Am. 2012;26:275–91.

3. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. Acta Trop. 2010;115(1-2):5–13.

4. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. 2015 [citado 17 de outubro de 2015]. Recuperado de: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/

5. Lescure F-X, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis. 2010;10:556–70.

6. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease. Glob Heart. 2015;10(3):139–44.

7. Hotez PJ, Fenwick A, Savioli L, Molyneux DH. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. Lancet. Elsevier Ltd; 2009;373(9674):1570–5.

8. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. Elsevier B.V.; 2009;115:14–21.

9. Brener Z. Biology of Trypanosoma cruzi. Annu Rev Microbiol. Annual Reviews; 1973;27(1):347–82.

10. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. Expert Rev Mol Med. 2010;12:1–23.

11. Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). Ann Trop Med Parasitol. 2006;100(8):663–77.

12. Pinto Dias JC, Rodriguez Coura J, Shikanai Yasuda MA. The present situation, challenges, and perspectives regarding the production and utilization of effective drugs against human Chagas disease. 2014;47(1):123–5.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.or

13. Tarleton RL. Immune system recognition of Trypanosoma cruzi. Curr Opin Immunol. 2007;19(4):430–4.

14. Kayama H, Takeda K. The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection. Microbes Infect. 2010;12(7):511–7.

15. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. J Immunol. 2006;177(6):3515–9.

16. Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. J Parasitol Res. 2012;2012:507874.

17. Gonçalves VM, Matteucci KC, Buzzo CL, Miollo BH, Ferrante D, Torrecilhas AC, et al. NLRP3 Controls Trypanosoma cruzi Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(10):1–11.

18. Celentano AM, González Cappa SM. In vivo macrophage function in experimental infection with Trypanosoma cruzi subpopulations. Acta Trop. 1993;55(3):171–80.

19. Basso B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. World J Exp Med. 2013;3(1):1–10.

20. Torrico F, Heremans H, Rivera M, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute Trypanosoma cruzi infection in mice. J Immunol. 1991;146(10):3626–32.

21. Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of Trypanosoma cruzi-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. Infect Immun. 1998;66(3):1208–15.

22. Reed S. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental Trypanosoma cruzi infections. J Immunol. 1988;140:4342–7.

23. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. Infect Immun. 1994;62(11):5177–82.

24. Sales P a, Golgher D, Oliveira R V, Vieira V, Arantes RME, Lannes-Vieira J, et al. The regulatory CD4+CD25+ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with Trypanosoma cruzi. Microbes Infect. maio de 2008;10(6):680–8.

25. Miyahira Y. Trypanosoma cruzi infection from the view of CD8+ T cell immunity an infection model for developing T cell vaccine. Parasitol Int. 2008;57(1):38–48.

26. Tarleton R. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with Trypanosoma cruzi. J Immunol. 1990;144(2):717–24.

27. Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF, DosReis G a. Activation-induced T cell death exacerbates Trypanosoma cruzi replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. J Immunol. 2012;160(3):1313–9.

28. Parodi C, Padilla AM, Basombrío MA. Protective immunity against Trypanosoma cruzi. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:288–94.

29. Jordan KA, Hunter CA. Experimental Parasitology Regulation of CD8 + T cell responses to infection with parasitic protozoa. Exp Parasitol. 2010;126(3):318–25.

30. Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL. CD8 + T cells in Trypanosoma cruzi infection. Curr Opin Immunol. 2009;21:385–90.

31. Dominguez MR, Silveira EL V, de Vasconcelos JRC, de Alencar BCG, Machado A V, Bruna-Romero O, et al. Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. PLoS One. 2011;6(7):1–12.

32. Martin DL, Weatherly DB, Laucella SA, Cabinian MA, Crim MT, Sullivan S, et al. CD8+ T-Cell Responses to Trypanosoma cruzi Are Highly Focused on Strain-Variant trans -Sialidase Epitopes. PLoS Pathog. 2006;2(8):0731–40.

33. Tzelepis F, Alencar BCG De, Penido MLO, Claser C, Machado A V, Bruna-romero O, et al. Infection with Trypanosoma cruzi Restricts the Repertoire of Parasite-Specific CD8+ T Cells Leading to Immunodominance. J Immunol. 2008;(16):1737–48.

34. Rosenberg CS, Martin DL, Tarleton RL. CD8+ T Cells Specific for Immunodominat Trans-sialidase Epitopes Contribute to Control of Trypanosoma cruzi Infection but are Not Required for Resistance1. J Immunol. 2010;185(1):560–8.

35. Virgilio S, Pontes C, Dominguez MR, Ersching J, Rodrigues MM, Vasconcelos JR. CD8 + T Cell-Mediated Immunity during Trypanosoma cruzi Infection : A Path for Vaccine Development ? Mediators Inflamm. 2014;2014.

36. SCOTT MT, GOSS-SAMPSON M. Restricted IgG isotype profiles in T. cruzi infected mice and Chagas' disease patients. Clin exp Immunol. 1984;58:372–9.

37. Brodskyn CI, Silva AM, Takehara HA, Mota I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with Trypanosoma cruzi. Immunol Cell Biol. 1989;343–8.

38. Kumar S, Tarleton RL. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of Trypanosoma cruzi. Parasite Immunol. 1998;20(5):207–16.

39. Bryan M a, Guyach SE, Norris K a. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(7):1–16.

40. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly L a., Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: A novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. EMBO J. 1998;17(2):384–95.

41. Hsu SY, Lin P, Hsueh a J. BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. Mol Endocrinol. 1998;12:1432–40.

42. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic Bcl-2 family member Bim. Immunity. 2002;16(6):759–67.

43. Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. Nat Rev Immunol. 2005;5(3):189–200.

44. Bouillet P, Huang DC, O'Reilly L a, Puthalakath H, O'Connor L, Cory S, et al. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death. Ann N Y Acad Sci. 2000;926:83–9.

45. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in Health and Disease. Oncotarget. 2015;6(27):23058–134.

46. Ludwinski MW, Sun J, Hilliard B, Gong S, Xue F, Carmody RJ, et al. Critical roles of Bim in T cell activation and T cell--mediated autoimmune inflammation in mice. J Clin Invest. 2009;119(6):1706–13.

47. Gillings AS, Balmanno K, Wiggins CM, Johnson M, Cook SJ. Apoptosis and autophagy: BIM as a mediator of tumour cell death in response to oncogene-targeted therapeutics. FEBS J. 2009;276(21):6050–62.

48. Akiyama T, Dass CR, Choong PFM. Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. Mol Cancer Ther. 2009;8(12):3173–80.

49. Bouillet P, Metcalf D, Huang DCS, Tarlinton DM, Kay TWH, Kontgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 Relative Bim Required for Certain Apoptotic Responses, Leukocyte Homeostasis, and to Preclude Autoimmunity. Science (80-). 1999;286:1735–8.

50. Reckling S, Divanovic S, Karp CL, Wojciechowski S, Belkaid Y, Hildeman D. Proapoptotic Bcl-2 family member Bim promotes persistent infection and limits protective immunity. Infect Immun. 2008;76(3):1179–85.

51. Lauer C, Brunner T, Corazza N. The proapoptotic Bcl-2 family member Bim plays a central role during the development of virus-induced hepatitis. J Immunol. 2012;188(2):916–22.

52. Wojciechowski S, Jordan MB, Zhu Y, White J, Zajac AJ, Hildeman D a. Bim mediates apoptosis of CD127lo effector T cells and limits T cell memory. Eur J Immunol. 2006;36(7):1694–706.

53. Grayson JM, Weant AE, Holbrook BC, Hildeman D. Role of Bim in regulating CD8+ T-cell responses during chronic viral infection. J Virol. 2006;80(17):8627–38.

54. Aguiló N, Uranga S, Marinova D, Martín C, Pardo J. Bim is a crucial regulator of apoptosis induced by Mycobacterium tuberculosis. Cell Death Dis. 2014;5(7):1–10.

55. Machado A, Cardoso J, Claser C, Rodrigues M, Gazzinelli R, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. Hum Gene Ther. 2006;17(9):898–908.

56. Boscardin SB, Kinoshita SS, Adriana E, Rodrigues MM. Immunization with cDNA Expressed by Amastigotes of Trypanosoma cruzi Elicits Protective Immune Response against Experimental Infection. Infect Immun. 2003;71:2744–57.

57. Akiyama T, Tanaka S. Bim: guardian of tissue homeostasis and critical regulator of the immune system, tumorigenesis and bone biology. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2011;59(4):277–87.

58. Morrot A, Terra-Granado E, Pérez AR, Silva-Barbosa SD, Milićević NM, Farias-de-Oliveira DA, et al. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(8):1–13.

59. Tzelepis F, Alencar BCG De, Marcus LO, Gazzinelli RT, Persechini PM, Rodrigues MM. Distinct Kinetics of Effector CD8 + Cytotoxic T Cells after Infection with Trypanosoma cruzi in Naïve or Vaccinated Mice Distinct Kinetics of Effector CD8+ Cytotoxic T Cells after Infection with Trypanosoma cruzi in Naive or Vaccinated Mice. Infect Immun. 2006;74:2477–81.

60. Ginty I, Hoogstraten-Miller S. Perineal swelling in a mouse. 2008;37(5):196–9.

61. Hübner A, Cavanagh-Kyros J, Rincon M, Flavell R a, Davis RJ. Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. Mol Cell Biol. janeiro de 2010;30(1):98–105.

62. Gutierrez FRS, Mineo TWP, Pavanelli WR, Guedes PMM, Silva JS. The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:236–45.

63. Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. Proc Natl Acad Sci. 2010;107(6):2568–73.

64. Cassado ADA, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. Front Immunol. 2015;6(225):1–9.

65. Cassado ADA, de Albuquerque JAT, Sardinha LR, Buzzo CDL, Faustino L, Nascimento R, et al. Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli. PLoS One. 2011;6(7):1–8.

66. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection. J Immunol. 2010;185(2):1150–7.

67. Gao W, Pereira M a. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to Trypanosoma cruzi. Int J Parasitol. 2002;32(2):167–70.

68. Weant AE, Michalek RD, Crump KE, Liu C, Konopitski AP, Grayson JM. Defects in apoptosis increase memory CD8+ T cells following infection of Bim-/- Fas lpr/lpr mice. Cell Immunol. 2011;271(2):256–66.

69. Bryan M a, Guyach SE, Norris K a. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in Trypanosoma cruzi infection of susceptible and resistant mice. PLoS Negl Trop Dis. janeiro de 2010;4(7):e733.