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

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 1×10^4 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 sobrevivência 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 óxido 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 observada uma diminuição da secreção de óxido nítrico e as citocinas pró-inflamatórias 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 1×10^4 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 .

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 *Triatominae* 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 América 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 tripomastigota 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, linfadenopatia 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 resposta 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 específica 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 sobrevivência. 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 inflamasoma 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 NLRP3 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 evidência 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 cascata 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- γ R^{-/-}) 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 β 2-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 epítomos 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 específicas (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 epítomos 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 epítomos 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 específicas no pico da infecção são específicas para o peptídeo imunodominante TsKb20 (ANYKFTLV) e 4-10% são específicas 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 específicas. 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 específicas. (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 esta última 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). Contrário 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 a 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 apoptossomo. 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 específicas 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 perda 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 pró-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.

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 parasitária pelo sistema imune e diminui a taxa de sobrevivência 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 sítio 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 Immunodominant 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, Balmano 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 CD127^{lo} 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.