



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO DA GLICOINOSITOLFOSFOLIPIDA (GIPL) DE
Trypanosoma cruzi NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES
HUMANAS DO SANGUE PERIFÉRICO**

JULIE ALVINA GUSS PATRÍCIO

Salvador - Bahia - Brasil

2002

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA GLICOINOSITOLFOSFOLIPIDA (GIPL) DE *Trypanosoma cruzi* NA
ATIVACÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS
DO SANGUE PERIFÉRICO**

JULIE A. GUSS PATRÍCIO

Orientador : Prof. Manoel Barral-Netto

Dissertação apresentada
para obtenção de grau
de Mestre em Patologia
Experimental

Salvador - Bahia - Brasil
2000



Ficha catalográfica elaborada na Biblioteca do Centro de
Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia

P314e Patricio, Julie A. Guss
Efeito da glicoinositolfosfolipida (GIPL) de *Trypano-*
soma cruzi na ativação de células mononucleares huma-
nas do sangue periférico / Julie A. Guss Patricio. -
Salvador : Universidade Federal da Bahia / Centro de
Pesquisas Gonçalo Moniz, 2000.
000 f.: il. tab.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Uni-
versidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gon-
çalo Moniz, 2000.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Macrófagos. 3. Citocinas.
I. Título.

CDU: 593.161:575.853

11021

11021
11021


11021
11021

EFEITO GLICOINOSITOLFOSFOLIPIDA (GIPL) DE *Trypanosoma cruzi* NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES HUMANAS DO SANGUE PERIFÉRICO

JULIE ALVINA GUSS PATRÍCIO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Ajax Atta
Professor Titular
UFBA



Dra. Milena Botelho Soares
Pesquisadora Assistente
CPqGM / FIOCRUZ



Dr. Manoel Barral-Netto
Professor Titular
FAMED / UFBA

**A meus pais por estarem presentes em
todas as etapas da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Dr. Manoel Barral-Netto pela dedicação e apoio na orientação em todos os momentos da realização deste trabalho.

A Dr. João Santana pelas correções, sugestões que grandemente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Andreia Arnholdt pelo muito que aprendi no pouco tempo em que realizamos nossos experimentos em conjunto.

A Dra. Lúcia Mendonça Previato pelo envio do GIPL sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

À Dra. Aldina Barral pelo apoio incondicional na realização dos experimentos.

À Dr. Francisco Reis, Dra. Maria Amélia Bulhões e ao Dr. Yuri Dias da Unidade de Cardiologia e Cirurgia Vascular do Hospital Universitário Professor Edgar Santos. que selecionaram os pacientes com cardiopatia chagásica crônica.

Aos alunos de iniciação científica Lucas Gama Lobo e Rubens pela auxílio com os experimentos .

À Silvia Andrade Cardoso pelo auxílio com os elisas e por estar sempre disposta a ajudar.

A Vera Imbroinize pela auxílio e apoio em todos os momentos que precisei.

À Sérgio Arruda pela ajuda com os experimentos de TGF- β .

À Jonhan Van Weyenbrgh pela informações técnicas que muito me ajudaram na realização deste trabalho.

A Jorge Clarêncio pelo auxílio com a Citometria de Fluxo.

A Theolis Barbosa pela amizade e por estar sempre presente nos momentos que necessitei da sua ajuda.

A Ivana Nunes Gomes e Cristiane Nascimento, minhas amigas, pelo exemplo de vida.

Aos demais colegas de laboratório que ajudaram a realizar este trabalho: Edvana Passos , Gisélia Santana, Marcos Almeida, Virgínia Vilhena, Régis Gomes, Fabiano e George Soares.

Ao Dr. Mitermayer Reis e Dra. Marilda Gonçalves, ao Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, a Dra. Milena Soares, ao Dr. Lain Pontes de Carvalho e ao Dr. Washington Conrado dos Santos pelo uso de equipamentos em seus laboratórios.

Aos meus professores do mestrado, Dr. Manoel Barral-Netto, Dra. Aldina Barral, Dr. Luís Freitas, Dra. Patricia Veras, Dr. Mitermayer Reis, Dra. Marilda Gonçalves, Dr. Eduardo Ramos, Dr. Geraldo Oliveira, Dr. Zilton Andrade, Dra Sônia Andrade, Dr. Lain Pontes de Carvalho e ao Dr. Washington Conrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag C10	glicosilfosfatidilinositol mucina
CRP	proteína reativa-C
GIPL	glicoinositolfosfolipideo
GPI	glicosilfosfatidilinositol
EPI	antígeno de epimastigota
IFN γ	interferon gama
IL-1	interleucina 1
L-6	interleucina 6
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
LPG	lipofosfoglican
LPS	lipopolissacarídeo bacteriano
NO	óxido nítrico
Th1	linfócitos T auxiliar secretando citocinas do padrão tipo 1
Th2	linfócitos T auxiliar secretando citocinas do padrão tipo 2
TGF β	fator de transformação e crescimento beta
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
CMSP	células mononucleares do sangue periférico

RESUMO

EFEITO DA GLICOINOSITOLFOSFOLIPIDA (GIPL) DE *Trypanosoma cruzi* NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS. JULIE ALVINA GUSS PATRÍCIO. Os GIPLs estão presentes no glicocálix de *Leishmania* e *T. cruzi* e são considerados importantes para a sobrevivência do parasito. Os GIPLs estão implicados na modulação da resposta macrofágica murina. Pouco se sabe sobre o efeito do GIPL de *T. cruzi* sobre células humanas. Nós investigamos o efeito do GIPL da cepa Colombiana de *T. cruzi* (GIPLcol) sobre macrófagos e linfócitos derivados de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). O GIPL (10 a 20 µg/ml) foi adicionado a culturas de macrófagos humanos estimulados ou não com LPS (500 pg/ml). A produção de TNF α , IL8, IL12 e IL10 foi dosada 48 horas depois. O GIPL não teve efeito sobre a produção de citocinas em macrófagos não estimulados. A adição do GIPL em células estimuladas com LPS levou à redução da produção de TNF- α , IL-12 e IL-10. Esta inibição não foi devido à toxicidade do GIPL, já que as células permaneceram viáveis depois de 5 dias de cultura com GIPL (10 µg/ml). Nós também testamos se a adição de GIPL modula a produção de IFN γ por linfócitos ativados por anti-CD3. Células Mononucleares do Sangue Periférico estimuladas com anti-CD3 solúvel (10 µg/ml) produzem altas concentrações de IFN- γ . A adição do GIPL não interferiu com esta produção. O GIPL não estimula a produção de IFN- γ e a proliferação de linfócitos de pacientes com doença de Chagas. Com base nesses dados, concluímos que o GIPL parece estar envolvido na sobrevivência parasitária, através da supressão de macrófagos.

ABSTRACT

HUMAN MONONUCLEAR CELLS ACTIVATION IS MODULATED IN THE PRESENCE OF GLICOINOSITOLPHOSPHOLIPID (GIPL) FROM *Trypanosoma cruzi*. GIPLs are present in the glycocalix of both *Leishmania* and *T. cruzi* and seem to be important to parasite survival. GIPLs have been implicated in modulating murine macrophage response. Little is known about the effect of GIPLs from *T. cruzi* on human cells. We have investigated the effect of GIPL from the Colombian strain of *T. cruzi* (GIPLcol) on human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages and lymphocytes. GIPL has been added (10 to 20 µg/ml) to unstimulated and LPS (500 pg/ml)-stimulated human macrophages. TNF α , IL-8, IL-12 and IL-10 production was been determined 48 hours later. GIPL has no effect on the cytokine production by unstimulated macrophages. The addition of GIPL to LPS-stimulated cells led to reduction of TNF- α , IL-12 and IL-10 production. Such an inhibition was not due to cell toxicity since cells remained viable even when cultured for 5 days with GIPL (10 µg/ml). We have also tested whether GIPL was able to influence IFN γ production by anti-CD3-stimulated lymphocytes. PBMC cultures stimulated with soluble anti-CD3 (10 µg/ml) produced high amounts of IFN- γ ; the addition of GIPL did not change such production. GIPL also does not stimulate IFN- γ production or lymphocyte proliferation by peripheral blood cells from patients with Chagas disease. Taken together our results suggest that GIPL has an inhibitory effect on human macrophage activation, but this effect does not extend to lymphocytes. GIPL also does not seem to function as an antigen. We conclude that GIPL might be involved in parasite survival, by suppressing macrophage response.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Considerações Gerais :	12
1.2	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> :	13
1.3	Aspectos clínicos da Doença de Chagas:	14
1.4	Imunologia da Doença de Chagas:	15
1.5	Moléculas de Superfície do <i>T. cruzi</i> :.....	18
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral:	22
2.2	Objetivos Específicos:	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Isolamento dos Glicoconjugados	23
3.2	Cultivo de Macrófagos.....	24
3.3	Dosagem de Citocinas	25
3.4	Proliferação e Ativação Linfocitária	25
3.5	Análise Estatística.....	26
4	RESULTADOS.....	27

4.1	Avaliação da Toxicidade do GIPL:	27
4.2	Efeito do GIPL sobre a Produção de Citocinas por Macrófagos Humanos:	28
4.2.1	Avaliação da capacidade do GIPL em estimular a produção de TNF- α :	28
4.2.2	Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de TNF- α induzida por LPS:	29
4.2.3	Efeito dose-dependente do GIPL sobre a produção de TNF α induzida por LPS:	31
4.2.4	Avaliação do efeito do GIPL sobre a inibição da produção de TNF- α em relação ao tempo de adição do GIPL:	32
4.2.5	Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de TNF- α induzida por LPS e IFN- γ :	33
4.2.6	Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-12 induzida por LPS:	34
4.2.7	Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-8 induzida por LPS:	35
4.2.8	Avaliação do efeito do GIPL sobre a inibição da produção de IL-8 em relação ao tempo de adição do GIPL:	36
4.2.9	Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-10 induzida por LPS:	37
4.3	Efeito do GIPL na Proliferação Celular:	38
4.4	Efeito do GIPL sobre Linfócitos Humanos Estimulados com Anti-CD3:	39
4.4.1	Avaliação da capacidade do GIPL em inibir a Produção de IFN- γ por linfócitos humanos estimulados com anti-CD3:	39
4.4.2	Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-5 por linfócitos humanos estimulados com anti-CD3:	40

5	<i>DISCUSSÃO</i>	41
6	<i>CONCLUSÃO</i>	49
7	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais :

Aproximadamente 18 milhões de pessoas na América Latina possuem doença de Chagas e 5 milhões destas pessoas estão no Brasil (WHO, 1991). Ela ocorre em 44% do território nacional e segundo o Ministério da Saúde, somente no ano de 1993, 1.336 pessoas foram internadas com a doença. Além disso, a cardiopatia chagásica ocupa um lugar proeminente entre as causas de incapacidade nas áreas rurais do Brasil (AKHAVAN, 1996)

Esta doença é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e leva ao comprometimento de vários sistemas, principalmente o cardiovascular e gastrointestinal (BRENER, 2000). A transmissão do *Trypanosoma cruzi* ao ser humano pode se dar através de insetos triatomíneos hematófagos, por transfusão de sangue, pela via transplacentária ou por acidentes em laboratório. A transfusão é uma preocupante forma de contágio. Estima-se que 0,7 a 0,8% dos doadores que procuram bancos de sangue no Brasil estão infectados (ACHE, 1993). Estudos realizados na Bolívia, Chile e Uruguai mostram que 1,6 a 8% dos filhos de mães com sorologia positiva nascem infectados (SCHMUNNIS, 2000).

A doença de Chagas é uma importante doença parasitária que leva milhares de pessoas à morte anualmente (BANCO MUNDIAL, 1993), além de ter um custo econômico significativo (SCHMUNNIS, 2000).

1.2 Ciclo de vida do *T. cruzi*:

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário da classe Kinetoplastidae, ordem Kinetoplastida da família Trypanosomatidae. Os seus transmissores são insetos triatomíneos, dentre estes os mais importantes são: *Rodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* e *Triatoma infestans*. Este último, estritamente domiciliar, é responsável pela transmissão no Brasil (SHERLOCK, 2000).

O ciclo vital do *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas: epimastigota (forma proliferativa no vetor), tripomastigota (forma infectiva) e amastigota (forma que se multiplica dentro da célula hospedeira).

O *T. cruzi* ao ser ingerido pelo vetor passa por várias transformações. No intestino médio do inseto, as formas epimastigotas se multiplicam e atingem o reto, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos e são eliminados pelo inseto no momento da alimentação, quando então infectam o hospedeiro vertebrado. Nessa forma, ele migra pela matriz extracelular, infecta as células adjacentes da derme, prolifera e então dissemina-se através do sistema circulatório. Este parasito intracelular vive em diferentes tipos celulares não só em macrófagos. Pode infectar células epiteliais e fibroblastos, além da musculatura lisa e esquelética. Já dentro da célula ele se transforma em amastigota voltando a se dividir até que a célula esteja repleta de parasitos, então se transformam novamente em tripomastigotas. A ruptura das células infectadas espalha os parasitos através do sangue para diferentes órgãos e tecidos reiniciando o ciclo. Com a progressão da doença há uma redução da parasitemia embora persistam as formas teciduais (SILVEIRA & REZENDE, 1994).

1.3 Aspectos clínicos da Doença de Chagas:

A doença de Chagas pode apresentar-se em duas fases principais, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é causada pela invasão das células pelos parasitos culminando no processo inflamatório e é caracterizada por febre alta, elevada parasitemia, acometimento cardíaco, ocorrendo linfadenopatia e/ou esplenomegalia em alguns casos. Na fase aguda da doença de Chagas ocorre parasitismo tecidual que leva ao processo inflamatório característico, associado à alterações vasculares, necrose degenerativa e presença de exsudato celular composto em sua maioria de macrófagos e linfócitos além de mastócitos e granulócitos em menor quantidade (ANDRADE, 2000). As lesões acometem principalmente o sistema nervoso periférico. No aparelho digestivo as lesões inflamatórias ocorrem nos plexos murais e o parasitismo nos tecidos é freqüente. Podem ocorrer alterações no sistema nervoso autônomo. Formas amastigotas foram encontradas nos focos inflamatórios ou em células gliais. Outros órgãos e tecidos também podem ser acometidos por lesões principalmente o fígado, o baço e a musculatura esquelética.

Na fase aguda da Doença de Chagas ocorre ativação policlonal de linfócitos (MINOPRIO, *et al*, 1989) levando à ativação das células $T\gamma\delta$ e das células B CD5+. Estas pequenas populações de células são consideradas as primeiras na linha de defesa do sistema imune e podem estar diretamente envolvidas na infecção por *T cruzi* (CARDILLO, 1993).

A fase crônica pode apresentar-se como indeterminada, cardíaca e digestiva. A forma indeterminada é identificada pela presença de infecção chagásica com ausência de manifestações clínicas, apresenta lesões cardíacas, mas estas são menos acentuadas que na forma cardíaca, apresenta ainda lesões inflamatórias e/ou fibróticas discretas no sistema

vascular, não apresenta alteração no eletrocardiograma e aumento da área cardíaca (REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS, 1985). Já a forma cardíaca apresenta alteração no sistema de condução e no ritmo cardíaco, miocardite crônica fibrosante culminando em alguns casos em cardiomegalia (MARIN-NETO, 2000). A forma digestiva é caracterizada por esofagopatia e colonopatia, podendo evoluir em alguns casos para megaesôfago e megacólon (ANDRADE, 2000).

1.4 Imunologia da Doença de Chagas:

Na inflamação aguda ocorre a participação primordial de neutrófilos, que são os primeiros a chegar no sítio da inflamação, e de macrófagos. A IL-8, IL-12 e TNF- α são conhecidas como monocinas, pois são produzidas por células da linhagem monócito-macrófago, enquanto que o IFN- γ é produzido por células T e NK.. Citocinas pró-inflamatórias como o IL-8, IL-12, IFN- γ e TNF- α participam no combate a infecção por diversos parasitos. A IL-8 é uma citocina que atua na sinalização para recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamatório e a IL-12, IFN- γ e TNF- α controlam multiplicação exagerada dos parasitos. A invasão de diversos tipos celulares, especialmente macrófagos, gera uma resposta inata do hospedeiro. Os macrófagos secretam IL-12 que ativa células NK a produzir IFN- γ , este age sobre macrófagos ativando sua ação microbicida (REED, 1994; GAZZINELLI *et al*, 1992). O TNF- α participa deste processo em sinergia com o IFN- γ para estimular a produção da enzima óxido nítrico sintase (NO) em macrófagos e a conseqüente produção de óxido nítrico, que possui uma atividade tóxica para os parasitos. Participam também do processo inflamatório citocinas anti- inflamatórias como a IL-10, também produzida por macrófagos, que inibem a produção de NO *in vitro* (GAZZINELLI *et al*, 1992). Provavelmente esta

citocina tenha um papel regulatório para antagonizar os efeitos de uma excessiva produção de IL-12, IFN- γ e TNF- α .

Na fase aguda da doença de Chagas há produção de citocinas tipo Th1/Th2 pelas células T CD4+. As células T CD4 podem se diferenciar em células T CD4 inflamatórias (Th1), capazes de ativar macrófagos, e gerar uma resposta imune celular ou células T CD4 auxiliares (Th2), ativam a produção de anticorpos pelas células B. As citocinas produzidas na fase inicial da infecção são de fundamental importância nesse processo de diferenciação. Dentre elas estão a IL-4 que influencia na diferenciação no sentido de produzir células tipo Th2 e a IL-12, produzidas por células B e macrófagos, que leva à produção de células tipo Th1. Além disso, a IL-12 leva a um aumento da produção de IFN- γ e TNF- α o que resulta no controle da parasitemia em infecções por *T. cruzi*. As citocinas IFN- γ e IL-10 exercem um efeito antagônico na resposta imune contra o *T. cruzi* (ALIBERTI *et al*, 1996) regulando a capacidade das células de matar parasitas. O IFN- γ controla a produção de óxido nítrico pelo macrófago o qual leva os parasitos à morte, enquanto o IL-10 previne tal efeito (GAZZINELLI *et al*, 1992). O IFN- γ tem ainda um efeito protetor, levando à ativação de macrófagos o que reduz a carga parasitária como consequência da sua atividade microbicida. No modelo murino de infecção experimental pelo *T. cruzi* observa-se que o efeito protetor do IFN- γ só ocorre se ele estiver presente na fase inicial da infecção aguda (CARDILLO, 1996). O IFN- γ está relacionado com a defesa do hospedeiro enquanto que a IL-10 com a sobrevivência do parasito. Foi demonstrado que em camundongos susceptíveis ao *T. cruzi*, a IL-10 é produzida em grandes quantidades, enquanto que o mesmo não acontece em camundongos resistentes (CARDILLO, 1996.). Entretanto se for administrado

um anticorpo anti- IFN- γ em camundongos resistentes, a produção de IL-10 é aumentada e o camundongo antes resistente se torna susceptível ao *T. cruzi* (REED, 1994).

É essencial a participação do IFN- γ , juntamente com o TNF- α , na ativação dos macrófagos. Estes, quando ativados, produzem óxido nítrico e radicais livres de oxigênio que possuem ampla atividade microbicida. Secretam citocinas como IL-1 e IL-6, cruciais na indução e amplificação da resposta inflamatória e IL-12, que orienta a diferenciação das células T CD4 virgens em células T inflamatórias efetoras. As citocinas tipo Th1 induzem o aumento da expressão de moléculas de MHC e receptores de TNF- α na superfície do macrófagos. A morte do parasito por macrófagos pode ser regulada dependendo das citocinas sintetizadas durante a resposta inflamatória. A infecção de macrófagos por *T. cruzi* estimula a produção de IL-12 e tratamento com anti-IL-12 agrava a infecção (ALIBERTI *et al*, 1996) O controle da replicação do *T. cruzi* é mais eficiente na ausência de IL-10 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996) já que ele funciona como antagonista de citocinas ativadoras como o TNF- α e IL-12 produzidos por macrófagos e IL-12 e IFN- γ produzidos por linfócitos (BRENER, 2000). As citocinas produzidas durante as primeiras semanas de infecção são consideradas críticas para mediar a ativação de macrófagos e tal ativação, acarreta na morte do parasito controlando assim o parasitismo do *T. cruzi*.

Além de IL-4 influenciar na produção de células Th2 também é responsável, juntamente com IL-10 e TGF- β por, bloquear as funções macrofágicas incluindo a sua atividade microbicida (MOORE, 1993).

A cardiopatia chagásica crônica é caracterizada por um infiltrado inflamatório de células mononucleares associado com danos no coração e no músculo esquelético (ANDRADE, 1991).

1.5 Moléculas de Superfície do *T. cruzi*:

A entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira tem sido relacionada à interação de moléculas na superfície do parasito e da sua célula alvo (YOSHIDA *et al*, 1997).

Na invasão das células pelas formas infectivas do *T. cruzi* ocorre uma série de eventos que incluem o reconhecimento de moléculas da superfície do parasito por receptores específicos na superfície da célula hospedeira (SCHENKMAN *et al*, 1994), transdução de sinal para liberação de Ca^{++} (DORTA *et al*, 1995) e mobilização dos lisossomos (TARDIEUX *et al*, 1992).

Uma das moléculas da superfície do *T. cruzi*, a gp35/50, está diretamente envolvida na entrada do parasito na célula proporcionando uma interação entre o parasito e a célula alvo (YOSHIDA *et al*, 1989). Outra molécula, a proteína C reativa (CRP), uma proteína encontrada no soro humano em concentrações altas na fase aguda da inflamação está presente em chagásicos na fase aguda da infecção (STEEL & WHITEHEAD, 1994). Acredita-se que a CRP do *T. cruzi* tem a capacidade de simular a CRP humana e é usada pelo parasito para se ligar aos fosfolipídios de membrana, aos glicoconjugados galactosilados, aos receptores da CRP da membrana do macrófago (ZAHEDI *et al*, 1989), à fibronectina (WHIRT & KIERSZEMBAUM, 1884) e ao C1q (RIMOLD *et al*, 1988).

Muitas moléculas da superfície do *T. cruzi* estão relacionadas à sua infectividade ou disseminação como a trans-sialidase, uma enzima envolvida na transferência de resíduos de açúcar de glicoconjugados da célula hospedeira para a superfície do parasita (FRASCH, 1994) e o Ag C10, um glicosilfosfatidilinositol mucina, abundante na superfície do *T. cruzi*, que possui a capacidade de suprimir a produção de TNF- α e IL-12 induzido pelo LPS (DE DIEGO, *et al* 1997).

Entre as moléculas da superfície dos parasitos encontram-se as glicolípidas. Essas moléculas têm a capacidade de proporcionar a sobrevivência em ambientes hostis como o aparelho digestivo do inseto, o espaço extracelular dos tecidos e os fagolisossomos formados nas células infectadas. Têm, ainda, a capacidade de evitar o reconhecimento e a destruição pelo sistema imune e mediar a interação específica entre o parasito e o hospedeiro.

Os Glicoinositolfosfolipideos (GIPLs) são encontrados compondo o glicocálix de diferentes parasitos inclusive do *T. cruzi*. Os GIPLs são encontrados em abundância em *Leishmania* e *T. cruzi*, eles fazem parte de uma família de glicoinositolfosfolipídios, possuem um núcleo semelhante as lipofosfoglicanas apresentando a seqüência Man α 1 - 3Man α 1 - 4 GlcN - PI e podem ser encontrados livres ou associados com GPI (MC CONVILLE, 1993). Os GIPLs estão em grande número nas formas amastigotas de *Leishmania*, sendo a molécula mais abundante na sua superfície. Apesar de serem encontrados em e grande quantidade compondo o glicocalix de *Leishmania* e *T. cruzi* sua função ainda é pouco conhecida.

O mecanismo para a ativação do sistema imune do hospedeiro na doença de Chagas é ainda pouco compreendido. Acredita-se que glicolípidas da superfície de *T. cruzi* podem estar

envolvidas. Alguns estudos mostram que âncoras de GPI, glicosilfosfatidilinositol, contribuem pela produção de óxido nítrico por macrófagos (CAMARGO *et al*, 1997). O GIPL pode estar envolvido na ativação policlonal de células B e na hipergamaglobulinemia que ocorre na fase aguda da doença de Chagas (BENTO *et al* 1996).

Alguns estudos relatam a participação dos GIPLs na proteção da *Leishmania*, inibindo a síntese de óxido nítrico por macrófagos (PROUDFOOD *et al*, 1995) e possibilitando a sobrevivência do parasito. Também foi demonstrado que GIPLs de *T cruzi* podem interferir na transdução de sinal nos linfócitos T CD4+ e CD8+ e bloquear a ativação de células T *in vitro* e *in vivo* através da sua porção ceramida, contribuindo dessa forma para que o parasito possa controlar a resposta celular do hospedeiro e manter a infecção crônica (GOMES *et al*, 1996). Ao contrário do observado para células T, é o domínio glicana do GIPL de *T cruzi* que induz a produção de Igs *in vitro* por células B (BENTO *et al*, 1996). Além disso, os GIPLs exercem ainda uma ação coestimulatória aumentando a secreção de IL-2 e induzindo a defosforilação do NFAT1 (fator nuclear de células T 1 ativadas) e sua translocação do citoplasma para o núcleo (BELLIO *et al*, 1999). Os GIPLs podem ainda estar envolvidos na diminuição de ICAM (uma molécula de adesão relacionada ao direcionamento de células do sistema imune para o foco inflamatório) já que isto já foi demonstrado para outra glicolípida, o LPG (LO *et al*, 1998). CD80 e CD86 são moléculas co-estimulatórias que funcionam como segundo sinal na ativação de linfócitos e macrófagos e também podem sofrer alguma influência dos GIPLs. Recentemente tem se demonstrado a importância da molécula CD1 na apresentação de antígenos não protéicos, assim, é possível que esta esteja diretamente relacionada com a apresentação de GIPL. Uma possível influência das glicolípidas no estímulo de apoptose poderá ser pesquisada através da avaliação do

aumento ou diminuição da expressão da molécula FAS, uma molécula da mesma família dos receptores de TNF- α que induz a célula a entrar em apoptose. Com base nestes estudos tem sido proposto para o GIPL de *T. cruzi* a capacidade de funcionar como mecanismo de evasão da infecção.

Foi demonstrado que o GIPL participa na modulação da resposta macrofágica de camundongos, mas pouco se conhece do seu efeito sobre células humanas. Torna-se necessário uma avaliação mais profunda da função macrofágica delineando-se a ação do GIPL de *T. cruzi* sobre macrófagos. Propomo-nos a estudar a interação dessas moléculas com células mononucleares humanas e seus efeitos na ativação de macrófagos e produção de citocinas.

2 OBJETIVOS

A hipótese do nosso estudo é que glicolípidas de *T. cruzi* têm papel importante na modulação da resposta imune do hospedeiro, favorecendo a sobrevivência do parasito.

2.1 Objetivo Geral:

Investigar o efeito do GIPL sobre a ativação de macrófagos e linfócitos humanos.

2.2 Objetivos Específicos:

- Examinar a atividade do GIPL sobre a produção *in vitro* de TNF α , IL-12, IL-10, IL-8, IL-5 e IFN γ por células; mononucleares humanas estimuladas com LPS;
- Avaliar a ação do GIPL sobre a ativação de linfócitos induzida por anti- CD3.
- Avaliar ao efeito do GIPL sobre linfócitos de pacientes na fase crônica da doença de Chagas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento dos Glicoconjugados

O procedimento utilizado foi o mesmo descrito previamente (PREVIATO *et al* , 1990). O GIPL foi isolado de epimastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. O parasita foi cultivado em meio BHI com hemina suplementado com 5% de SBF por 5 dias a 26°C. Quinze mililitros da cultura fresca foram transferidos para recipientes contendo 200ml de BHI-hemina-SBF e incubados por 5 dias a 26°C com agitação (80 rpm). O volume de cada recipiente foi transferido para 1L de BHI-hemina-SBF incubados novamente e após o crescimento exponencial, as células foram coletadas, lavadas com salina a 0,9% e estocadas a -20°C. O extrato aquoso foi concentrado, inativado pelo calor e o precipitado foi concentrado na fração R, uma fração rica em proteínas. O precipitado restante foi extraído com 45v/v de solução aquosa de fenol a 75% durante 15 min. A camada aquosa a partir da extração fenólica foi dialisada, liofilizada, dissolvida em água e aplicada à coluna de Bio-Gel P100. A eluição foi feita em água deionizada em fluxo de 6ml/h e o perfil da eluição determinado através da dosagem de carboidrato neutro. O material obtido no volume de exclusão da coluna foi liofilizado e submetido à extração com clorofórmio/metanol/água (10:10:3). O material solúvel em clorofórmio/metanol/água foi evaporado completamente, sobre pressão reduzida, em evaporador rotatório e o resíduo foi redissolvido em água e precipitado com 5 volumes de metanol durante 18h a 20°C. Os GIPLs purificados foram

dissolvidos em água e filtrados para serem utilizados em culturas de células para avaliar a sua atividade na resposta imune do hospedeiro. O GIPL utilizado foi preparado pelo grupo da Dra. Lúcia Mendonça Previato, UFRJ- RJ.

3.2 Cultivo de Macrófagos

Para verificar a produção de IL-12, TNF- α , IL-10 e IL-8 por macrófagos expostos ao GIPL, sangue de indivíduos sadios, provenientes de bolsas cedidas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemoba), foi submetido a um gradiente de centrifugação em FICOLL-HIPAQUE (Lymphocyte Separation Medium; Bionetics Laboratory, Kensington, EUA) com o objetivo de separar as células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Após a separação, estas células foram lavadas e ressuspensas a 5×10^6 células/ml após contagem em câmara de Neubauer e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (10mM), L-glutamina (2mM), penicilina (200UI/ml) e estreptomicina (100 ug/ml) e 5% de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island NY, EUA). O cultivo destas células deu-se em placas de 24 poços incubadas à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 6 dias. Depois desse período, estas células foram ativadas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; Sigma, St. Louis, MO, USA) simultaneamente, 3 a 24 horas antes ou 3 horas depois da adição do GIPL e incubadas por 48 horas, quando o sobrenadante dos diferentes tratamentos foi colhido e estocado a -20 °C até o momento da dosagem.

A concentração de LPS necessária para indicação de uma ativação sub-ótima dos macrófagos foi definida em 500 pg/ml através da realização de uma curva dose resposta.

3.3 Dosagem de Citocinas

Para determinação da produção de citocinas nos sobrenadantes de cultura de macrófagos estimulados com GIPL foram utilizados ensaios imunoenzimáticos de ELISA de captura de antígeno utilizando Kits comerciais (Genzyme e R&D, EUA).

As citocinas dosadas foram : IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5 e IL-8. as sensibilidades analíticas dos testes foram de >5pg/ml para IL-12, >3pg/ml para IFN- γ , >4,4 pg/ml para TNF- α , >1,5 pg/ml para IL-10 e 10 pg/ml para IL-8.

3.4 Proliferação e Ativação Linfocitária

A fim de avaliar o efeito do GIPL sobre os linfócitos T de doadores sadios, as CMSP na concentração de 2×10^5 foram cultivadas em duplicata, utilizando placas de cultura estéreis, de material inerte, com 96 poços de fundo chato (Costar, New York, EUA), pré-incubados com anti-CD3 solúvel clone OKT-3 (20 μ g/ml) solúvel e expostas ao GIPL (10 μ g/ml). O grupo controle foi composto de células igualmente estimuladas com anticorpo monoclonal anti-CD3 , mas não expostas ao GIPL. Após 2 dias de incubação foi colhido o sobrenadante para avaliar a produção das citocinas IFN- γ e após 4 dias o sobrenadante foi colhido para a dosagem de IL-5.

Foram selecionados 15 pacientes com cardiopatia chagásica crônica, diagnosticados e acompanhados na unidade de Cardiologia e Cirurgia Vascular do Hospital Universitário Professor Edgard Santos. O diagnóstico foi estabelecido com base nos achados clínicos e pela positividade da reação sorológica através de ensaios imunoenzimáticos de ELISA de captura de antígeno e imunofluorescência para *T. cruzi*, além dos achados no

eletrocardiograma (ECG) (ANDRADE, 2000). O efeito do GIPL sobre células desses pacientes, foi avaliado através de CMSP que foram obtidas de 10 ml de sangue periférico heparinizado. Aliquotas de células na concentração de 2×10^5 (200 μ l) foram cultivadas em triplicata, utilizando placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Costar, New York, EUA) e estimuladas com GIPL (5 ou 10 μ g/ml) ou extrato solúvel de epimastigota de *T. cruzi* (5 μ g/ml). O extrato de epimastigota foi preparado da cepa 12 SF de *T. cruzi*. Os epimastigotas foram cultivados em meio LIT, lavados três vezes com PBS, ressuspensos em PBS10⁹/ml epimastigotas, rapidamente congelados a -70°C , descongelados à 37°C por 6 vezes e centrifugado por 10min.a 16g. O sobrenadante foi coletado, a dosagem protéica foi determinada pelo método de Lowry's , ajustada para 1mg/ml e estocada à -20°C .

As células foram incubadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 e mantidas por 5 dias. No último dia de cultura, foi adicionado, às placas, 1 μ Ci de timidina tritiada [^3H timidina] (Amersham, Inglaterra). Após aproximadamente 16 horas de incubação, a captação de timidina foi medida em contador de de partículas β (Wallac 1409, Finlândia).

3.5 Análise Estatística

As comparações das diversas condições foram avaliadas pelo teste *t* de Student. Os diferenças foram considerados significativos quando *P* for inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da Toxicidade do GIPL:

Em experimentos preliminares foi observado que o GIPL diminui a produção de TNF α em macrófagos estimulados com LPS. Para excluir um possível efeito tóxico do GIPL, as CMSP foram incubadas com e sem o glicoconjugado por um período de 24, 48 e 72 horas. A toxicidade do GIPL foi avaliada através da contagem das CMSP viáveis. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa quanto a viabilidade observadas em células expostas ou não ao GIPL. Estes resultados indicam que o GIPL não é tóxico para CMSP (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade de CMSP incubadas com GIPL .

Viabilidade (%) de CMSP			
	24h	48h	72h
MEIO	90,5	88,8	85,5
GIPL	94,9	85,5	80,5

As células foram incubadas na concentração de 4×10^6 em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e expostas ao GIPL (20 $\mu\text{g/ml}$). As células viáveis foram contadas após 24, 48 e 72 horas após a adição do GIPL. A diferença entre o grupo controle (MEIO) e as células expostas ao GIPL não foi significativa.

4.2 Efeito do GIPL sobre a Produção de Citocinas por Macrófagos

Humanos:

4.2.1 Avaliação da capacidade do GIPL em estimular a produção de TNF- α :

Para verificar a capacidade do GIPL em induzir a produção TNF- α por CMSP, foram realizados experimentos em que as células aderentes foram cultivadas em duplicatas com GIPL na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$. Enquanto macrófagos cultivados com meio, sem estímulo, produziram 19,1 pg/ml de TNF- α , macrófagos cultivados em meio e expostos ao GIPL produziram 16 pg/ml de TNF- α . Esses experimentos indicam que o GIPL não induz a produção de TNF- α por macrófagos humanos.

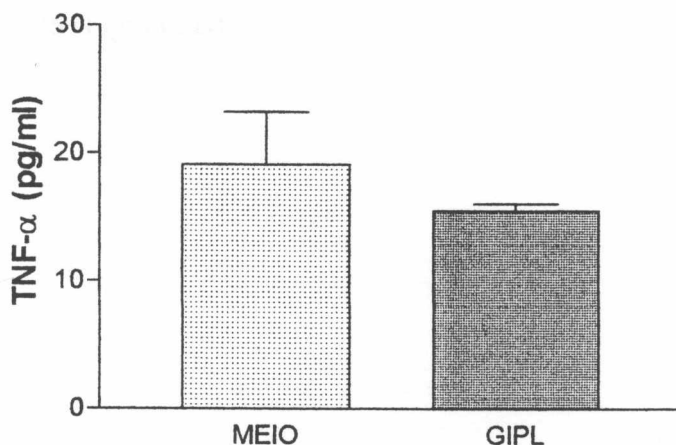


Figura 1. GIPL de *T. cruzi* não induz a produção de TNF- α . Macrófagos foram incubados por 6 dias e expostos ao GIPL na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$. Após 48 horas, o sobrenadante das culturas, em duplicata, foi recolhido para a dosagem de TNF α . Os dados correspondem a um experimento representativo de 8 experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre células expostas ao GIPL e não expostas.

4.2.2 Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de TNF- α induzida por LPS:

Como o GIPL não foi capaz de induzir a produção de TNF- α , investigamos a capacidade do mesmo em interferir na produção de TNF- α por macrófagos humanos estimulados com LPS. O GIPL foi adicionado às culturas de macrófagos em concentrações de 5 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$, simultaneamente ao LPS (500 pg/ml) e depois de 48 horas o sobrenadante foi colhido para a dosagem de TNF- α . O GIPL na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ foi capaz de reduzir a produção de TNF- α em 3,4 vezes quanto comparado às células estimuladas com LPS mas não expostas ao glicoconjugado (Figura 2A). Na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ a molécula foi capaz de reduzir 3,7 vezes a produção de TNF- α . Observou-se com isso que o GIPL tem a capacidade de diminuir a produção de TNF- α por macrófagos humanos estimulados com LPS (Figura 2B).

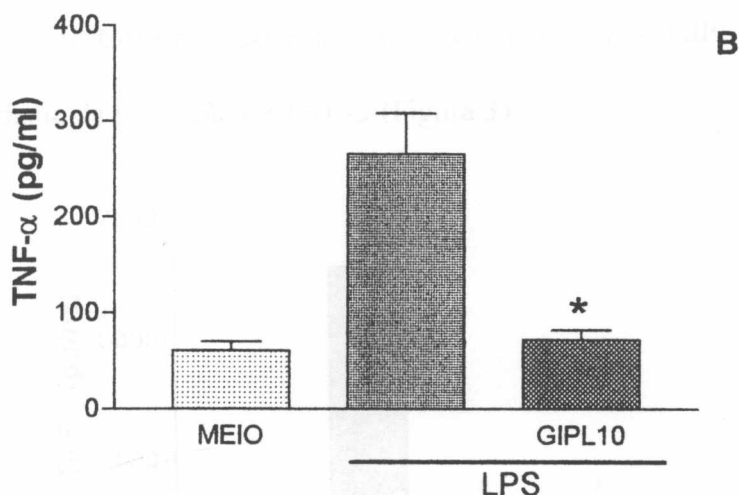
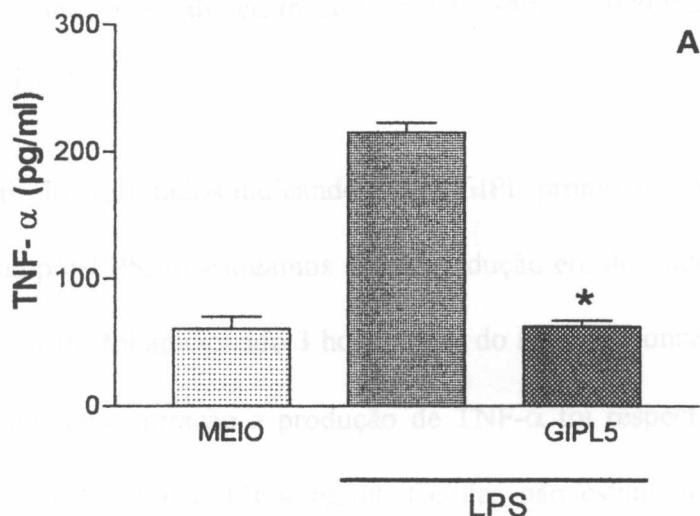


Figura 2 - O GIPL diminui a produção de TNF α em macrófagos humanos estimulados com LPS. Macrófagos foram incubados por 6 dias, expostos ao GIPL na concentração de 5 e 10 μ g/ml e, simultaneamente, estimulados com LPS (500 pg/ml). Após 48 horas, o sobrenadante das culturas realizadas em duplicatas, foi recolhido para a dosagem de TNF α . Os dados correspondem a um experimento representativo de 3 e 8 experimentos independentes correspondentes as doses de 5 e 10 μ g/ml. * $p < 0,05$ em relação ao LPS.

4.2.3 Efeito dose-dependente do GIPL sobre a produção de TNF α induzida por

LPS:

A partir dos resultados indicando que o GIPL promove a redução da produção de TNF- α induzida por LPS, investigamos se esta redução era dependente da dose da molécula. Para tanto, o GIPL foi adicionado 3 horas antes do LPS em concentrações de 0,5, 1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ e em cada concentração a produção de TNF- α foi respectivamente 1.356,5 pg/ml , 1.295 pg/ml , 561,8 pg/ml e 126,4 pg/ml . Células não estimuladas (MEIO) apresentaram uma produção de 4,3 pg/ml de TNF- α enquanto que células estimuladas com LPS produziram 6.498 pg/ml . Com este experimento, observamos que o GIPL levou a uma redução dose-dependente da produção de TNF- α (Figura 3).

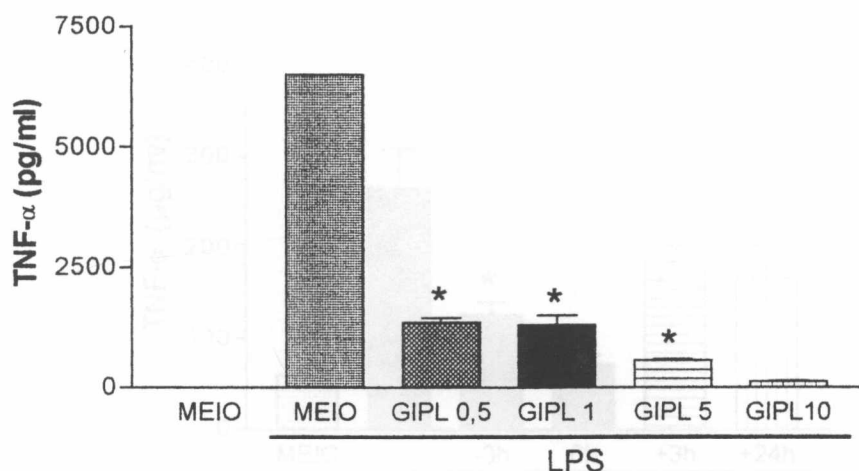


Figura 3 - A diminuição da produção de TNF α em macrófagos humanos estimulados com LPS pelo GIPL é dependente da dose. Macrófagos foram incubados por 6 dias e expostos ao GIPL na concentração de 0,5, 1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ e 3 horas depois estimulados com LPS (500 pg/ml). Após 48 horas, o sobrenadante das culturas, em duplicata, foi recolhido para a dosagem de TNF α . Os dados correspondem a um experimento representativo de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao LPS.

4.2.4 Avaliação do efeito do GIPL sobre a inibição da produção de TNF- α em relação ao tempo de adição do GIPL:

Como o GIPL mostrou ser um potente inibidor da produção de TNF- α , decidimos avaliar sua ação em diferentes tempos de adição. Conforme pode ser observado na figura 4, células não estimuladas produzem pouco TNF- α enquanto que células estimuladas com LPS produziram 265,2 pg/ml. Células estimuladas com LPS e expostas ao GIPL produziram em 0h 72,3 pg/ml (adição simultânea), em -3h 126,4 pg/ml (pré-tratamento com GIPL), em +3h 184,4 pg/ml e em +24h 166,8 pg/ml (pós-tratamento com GIPL), de TNF- α . Observamos que o GIPL não reduz significativamente a produção de TNF- α quando adicionado 3 e 24 horas depois do LPS, atuando somente se adicionado simultaneamente ou 3 horas antes.

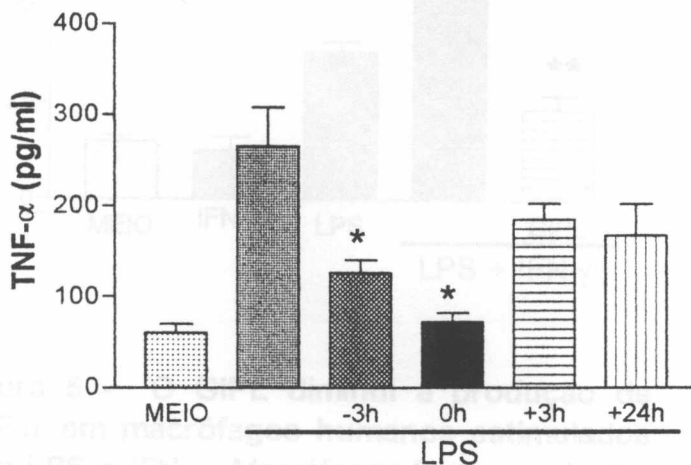


Figura 4 - O GIPL diminui a produção de TNF- α em macrófagos humanos estimulados com LPS. Macrófagos incubados por 6 dias foram estimulados com LPS (500 pg/ml) e expostos 10 μ g/ml de GIPL 3 horas antes (-3h), pré-tratamento, simultaneamente (0h), 3 (+3h) e 24 horas depois (+24h), pós-tratamento. Após 48 horas, o sobrenadante das culturas, em duplicata, foi recolhido para a dosagem de TNF- α . Os dados correspondem a um experimento representativo de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao LPS.

4.2.5 Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de TNF- α induzida por LPS e IFN- γ :

Para avaliar o efeito do GIPL sobre a produção de TNF- α produzida por estímulo potente, macrófagos foram estimulados simultaneamente com LPS (500 pg/ml) e IFN- γ (500 U/ml) e expostos ao GIPL (10 μ g/ml). Células não estimuladas ou estimuladas com IFN- γ produzem pouco TNF- α . Células estimuladas com LPS produziram 38,4 pg/ml enquanto que as estimuladas com LPS+ IFN- γ produziram 87,6 pg/ml, mostrando que o IFN- γ potencializa o efeito do LPS. Quando os macrófagos foram estimulados com LPS+ IFN- γ e expostos ao GIPL observou-se uma diminuição de 4 vezes (23,5 pg/ml) na produção de TNF- α . (Figura 5).

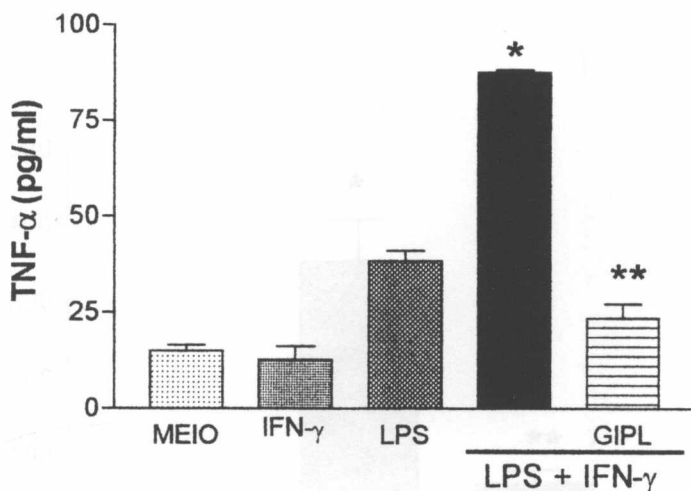


Figura 5 - O GIPL diminui a produção de TNF- α em macrófagos humanos estimulados com LPS e IFN- γ . Macrófagos foram incubados por 6 dias e expostos ao GIPL na concentração de 10 μ g/ml e simultaneamente estimulados com LPS (500 pg/ml) e IFN- γ (500 U/ml). Após 48 horas, o sobrenadante das culturas em duplicata, foi recolhido para a dosagem de TNF- α . Os dados correspondem a um experimento representativo de 3 experimentos independentes. *p<0,05 em relação ao meio e **p<0,05 em relação a LPS + IFN- γ .

4.2.6 Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-12 induzida por LPS:

Com o objetivo de avaliar a ação do GIPL sobre a produção de outras citocinas, macrófagos humanos foram estimulados com LPS, expostos ao GIPL na concentrações de 10 $\mu\text{g/ml}$ por um período de 48 horas e o sobrenadante foi coletado para a dosagem de IL-12. Células não estimuladas (MEIO) produzem muito pouca IL-12 (42,6 pg/ml), enquanto células estimuladas com LPS produzem 351 pg/ml de IL-12. Já células estimuladas com LPS e expostas ao GIPL produzem 59,6 pg/ml ou seja 5 vezes menos IL-12 que quando estimuladas somente com LPS. (Figura 6).

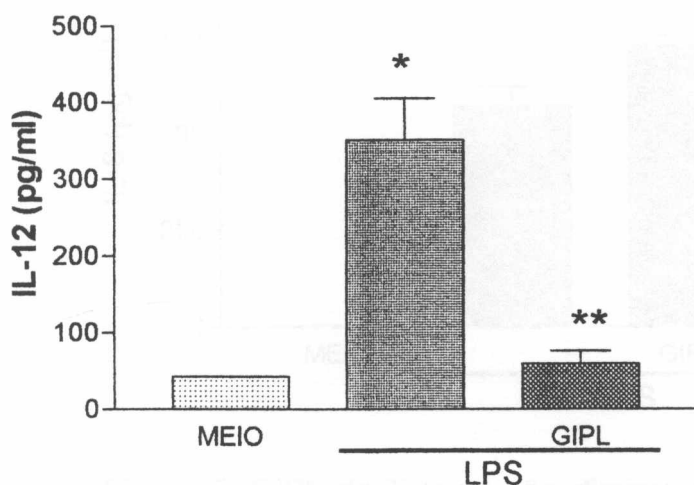


Figura 6 - O GIPL diminui a produção de IL-12 em macrófagos humanos estimulados com LPS. Macrófagos foram incubados por 6 dias e expostos ao GIPL na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ e simultaneamente estimulados com LPS (500 pg/ml). Após 48 horas, o sobrenadante das culturas em duplicata, foi recolhido para a dosagem de IL-12. Os dados correspondem a um experimento representativo de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao meio e ** $p < 0,05$ em relação a LPS.

4.2.7 Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-8 induzida por LPS:

Em seguida, investigamos a ação do GIPL sobre a produção de IL-8 por macrófagos humanos estimulados com LPS. Células não estimuladas (MEIO) apresentaram uma produção de 1,8 pg/ml de IL-8, enquanto células estimuladas com LPS produziram 527,9 pg/ml. Isto representa uma produção de cerca de 300 vezes maior em células estimuladas. Células expostas ao GIPL e ao LPS produziram 732,4 pg/ml. Portanto, os resultados mostraram que na dose de 10 $\mu\text{g/ml}$ o GIPL não interferiu com a produção de IL-8 em células estimuladas com LPS (Figura 7).

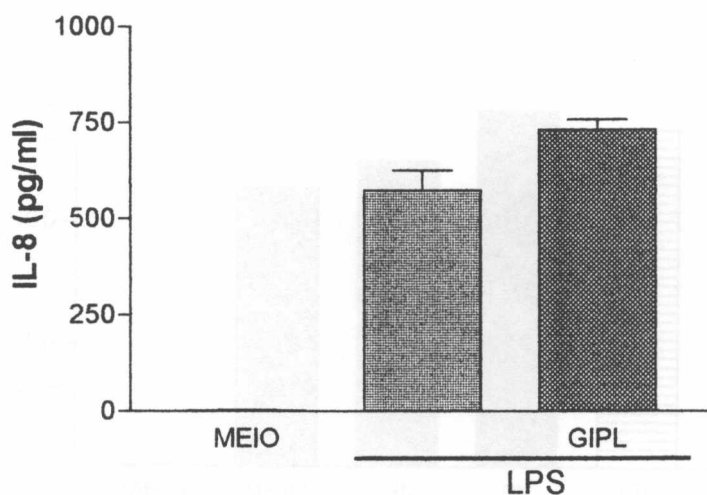


Figura 7. GIPL de *T.cruzi* não diminui a produção de IL-8 induzida por LPS. Macrófagos foram incubados por 6 dias, expostos a 10 $\mu\text{g/ml}$ de GIPL e simultaneamente estimulados com LPS (500 pg/ml). Após 48 horas, o sobrenadante das culturas, em duplicata, foi recolhido para a dosagem de IL-8. Os dados correspondem a um experimento representativo de 3 experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre as células estimuladas com LPS e expostas ao GIPL e as não expostas.

4.2.8 Avaliação do efeito do GIPL sobre a inibição da produção de IL-8 em relação ao tempo de adição do GIPL:

Com base no resultado anterior, decidimos avaliar se o tempo de adição do GIPL em relação ao LPS tinha alguma influência na produção de IL-8. O GIPL foi adicionado simultaneamente (0h), 3 horas antes (-3h), horas, pré-tratamento e 3 horas depois (3h), horas, pós-tratamento, do LPS. Células não estimuladas ou expostas ao GIPL também não induziram produção de IL-8. Células estimuladas com LPS produziram 527,9 pg/ml de IL-8. Células estimuladas com LPS e expostas ao GIPL em 0h produziram 732,4 pg/ml em -3h 628,45 pg/ml e em +3h 694,2 pg/ml. Não foi observada diferença significativa entre LPS e GIPL + LPS (Figura 8).

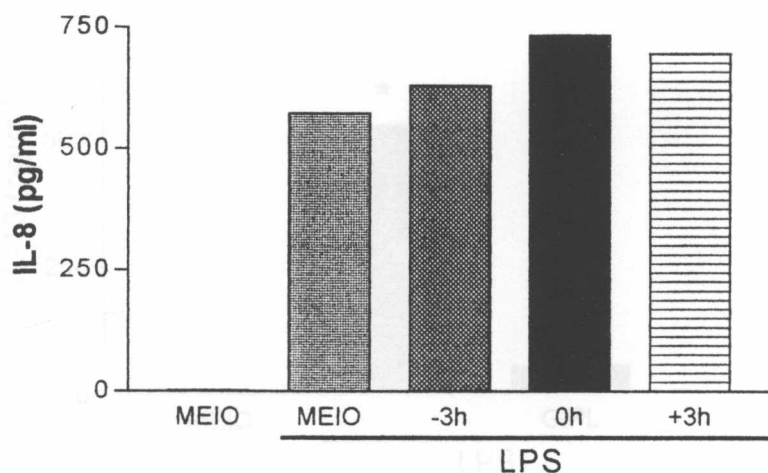


Figura 8 - O GIPL não altera a produção de IL-8 em macrófagos humanos estimulados com LPS. Macrófagos incubados por 6 dias foram estimulados com LPS (500 pg/ml) e expostos ao GIPL na concentração 10 μ g/ml de GIPL 3 horas antes (-3h), pré-tratamento, simultaneamente (0h) e 3 horas depois (+3h), pós-tratamento. Após 48 horas, o sobrenadante das culturas em duplicata, foi recolhido para a dosagem de IL-8. Os dados correspondem a um experimento representativo de 3 experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre as células estimuladas com LPS e expostas ao GIPL e as não expostas nos diferentes tempos testados.

4.2.9 Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-10 induzida por LPS:

Em vista dos resultados obtidos decidimos avaliar se o GIPL interfere com a produção de uma citocina produzida por macrófagos com um padrão de resposta Th2, como a IL-10. Para tanto, culturas de macrófagos humanos foram estimuladas com LPS e expostas ao GIPL na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ por um período de 48 horas. Como poderíamos esperar, células não estimuladas (MEIO) não produziram IL-10 e células estimuladas com LPS produziram grande quantidade da citocina. Surpreendentemente, o GIPL reduziu em cerca de 10 vezes a produção de IL-10 por células estimuladas com LPS, levando a uma significativa diminuição da produção desta citocina (Figura 9).

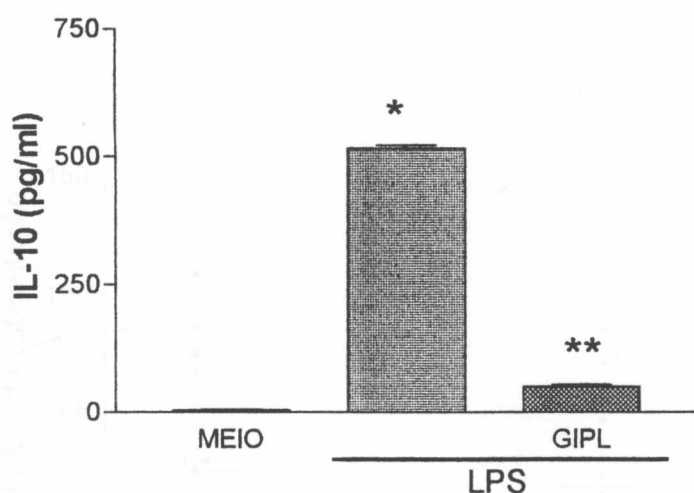


Figura 9 - O GIPL diminui a produção de IL-10 em macrófagos humanos estimulados com LPS. Macrófagos foram incubados por 6 dias e expostos ao GIPL na concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ e 3 horas depois estimulados com LPS (500 pg/ml). Após 48 horas, o sobrenadante das culturas, em duplicata, foi recolhido para a dosagem de IL-10. Os dados correspondem a um experimento representativo de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao meio e ** $p < 0,05$ em relação a LPS.

4.4 Efeito do GIPL sobre Linfócitos Humanos Estimulados com Anti-CD3:

4.4.1 Avaliação da capacidade do GIPL em inibir a Produção de IFN- γ por linfócitos humanos estimulados com anti-CD3:

Com o objetivo de avaliar se o GIPL também exerce um efeito em linfócitos, CMSP de indivíduos normais foram incubadas com anti-CD3 ou GIPL, e com GIPL mais anti-CD3 e a presença de IFN- γ no sobrenadante foi avaliada. Foi observado que GIPL não é capaz de induzir a produção de IFN- γ . Entretanto, anti-CD3 induz uma produção considerável de IFN- γ e essa produção não é alterada significativamente na presença do GIPL. O GIPL não induz a produção de IFN- γ nem inibe sua produção induzida pelo anti-CD3. (Figura 11).

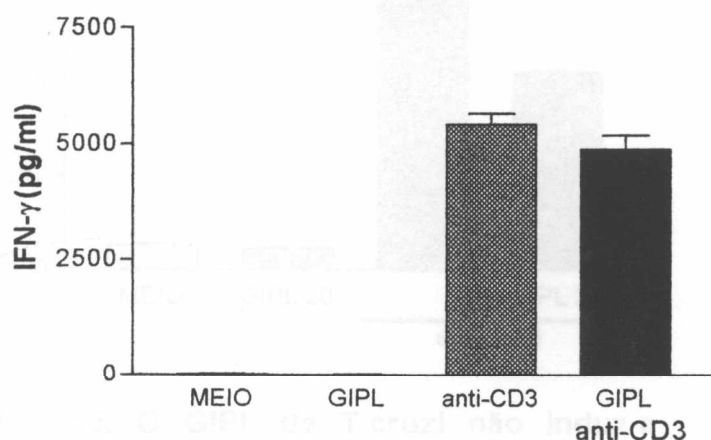


Figura 11. Efeito do GIPL na produção de IFN- γ por linfócitos humanos. As células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas, em duplicata, na concentração de 2×10^5 , estimuladas com anti-CD3 ($10 \mu\text{g/ml}$) e expostas ao GIPL na concentração de $20 \mu\text{g/ml}$. O grupo controle foi composto de células igualmente estimuladas com anti-CD3, mas não expostas ao GIPL. Após 2 dias de incubação foi colhido o sobrenadante para avaliar a produção de IFN- γ . Os dados correspondem a um experimento representativo de 2 experimentos independentes.

4.4.2 Avaliação do efeito do GIPL sobre a produção de IL-5 por linfócitos humanos estimulados com anti-CD3:

Em seguida, verificamos a ação de GIPL sobre outra citocina produzida por linfócitos, a IL-5. Células de indivíduos normais foram estimuladas com anti-CD3 (10 $\mu\text{g/ml}$), expostas ao GIPL (20 $\mu\text{g/ml}$) e a GIPL + anti-CD3. Células sem estímulo (MEIO), não produziram IL-5. O GIPL também não induziu a produção de IL-5. O anti-CD3 induz, isoladamente, uma produção de 787,9 pg/ml e de 529,8 pg/ml quando adicionado associado ao GIPL. A diferença observada não foi significativa, o GIPL não é capaz de reduzir a produção de IL-5

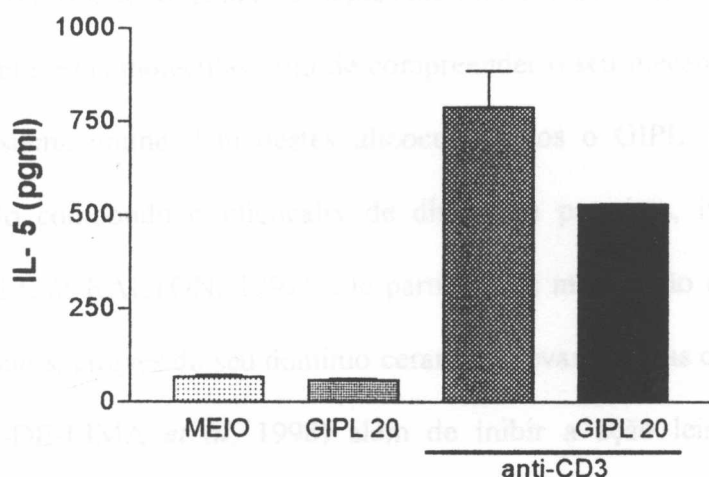


Figura 12. O GIPL de *T.cruzi* não induz a produção de IL-5 por linfócitos humanos e nem reduz sua produção em linfócitos humanos estimulados com anti-CD3.

As células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas em duplicata na concentração de 2×10^5 , estimuladas com anti-CD3 (10 $\mu\text{g/ml}$) e expostas ao GIPL na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$. O grupo controle foi composto de células igualmente estimuladas com anti-CD3, mas não expostas ao GIPL. Após 2 dias de incubação foi colhido o sobrenadante para avaliar a produção de IL-5. Os dados correspondem a um experimento representativo de 2 experimentos independentes e não apresentam diferenças significativas.

5 DISCUSSÃO

Moléculas da superfície de parasitos estão relacionadas com a infectividade e o escape do sistema imunológico do hospedeiro. Dentre estas moléculas estão as glicolípidas, que têm a capacidade de proporcionar a sobrevivência em ambientes hostis como o aparelho digestivo do inseto, os fagolisossomos e o ambiente intracelular. Têm, ainda, a função de evitar o reconhecimento e a destruição pelo sistema imune e mediar a interação específica entre o parasito e o hospedeiro. Diante de ações tão diferenciadas torna-se necessário aprofundar o estudo sobre estas moléculas afim de compreender o seu mecanismo de ação e sua relação com o sistema imune. Um destes glicoconjugados o GIPL, glicoinositolfosfolipideo, é encontrado compondo o glicocalix de diferentes parasitos, inclusive do *T. cruzi* (MC CONVILLE & RALTON, 1997). Ele participa na modulação da resposta macrofágica de camundongos, através do seu domínio ceramida, levando estas células a entrar em apoptose (FREIRE-DE-LIMA *et al*, 1998) além de inibir a ação leishmanicida de macrófagos (PROUDFOOT *et al*, 1995). Pouco se conhece do efeito do GIPL sobre células humanas. Em vista disso, decidimos investigar o efeito do GIPL na produção de citocinas por macrófagos humanos.

Os macrófagos são responsáveis por controlar a replicação e a disseminação de parasitos nos vertebrados. Estudos mostram que infecção por *T.gondii* e *T.cruzi* levam a uma ativação da função efetora dos macrófagos, controlando a parasitemia na fase aguda da infecção e a produção de óxido nítrico (VESPA *et al*, 1994). Dessa forma, a supressão da função efetora

de macrófago parece ser uma estratégia crucial para o estabelecimento da infecção e persistência do parasito no hospedeiro vertebrado (GAZZINELLI, 1998). O controle da parasitemia pelos macrófagos está diretamente ligado à produção de citocinas havendo sido mostrado que o *T. cruzi* tem a capacidade de estimular a síntese de citocinas por macrófagos (ALIBERTI *et al*, 1996). As citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12 são importantes mediadores da resistência contra os parasitos intracelulares (GAZZINELLI *et al*, 1996). Sabemos que a produção dessas citocinas são importantes na ativação de macrófagos e a produção de IL-8 na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Portanto parece claro que a produção destas citocinas está relacionada com a proteção da célula hospedeira contra a infecção pelo parasito. A IL-10 tem um efeito antagônico ao dessas citocinas e geralmente o aumento da sua produção está associada a susceptibilidade ao parasito (REED, 1994). Estudos realizados na fase inicial da infecção aguda por *T. cruzi* mostram um efeito protetor do IFN- γ associando-o à defesa do hospedeiro (CARDILLO, F., 1996). Células mononucleares do sangue periférico infectadas *ex vitro* apresentam um aumento na produção de TNF- α (VOORHIS *et al*, 1992). Também já foi mostrado um aumento da produção de IL-12 em macrófagos de camundongos infectados por tripomastigotas de *T. cruzi* (ALIBERT *et al*, 1996), enquanto que o aumento da IL-8 foi mostrado em infecções por promastigotas de *L. major* (BADOLATO *et al* 1996) ou por *T. gondii* (DENNEY *et al*, 1999), em células HeLa e monócitos humanos respectivamente. Também foi observado que a IL-8 inibe *in vitro* a proliferação de *T. gondii* (WILSON & REMINGTON, 1979), efeito contrário ao observado em infecções por *T. cruzi*, onde um aumento da IL-8 leva a uma aumento da parasitemia (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996). Como observado, a

produção de citocinas está intimamente relacionada ao controle da infecção ou ao escape do parasita do sistema imunológico.

Moléculas presentes na superfície de microorganismos são capazes de ativar macrófagos. Dentre estas moléculas estão o LPS (BODEL & ATKINS, 1967) e lipoproteínas bacterianas (HOFFMANN *et al*, 1988). Recentemente verificou-se que a âncora de GPI de tripomastigotas de *T. cruzi* induz a síntese de TNF- α , IL-12 e NO em camundongos (CAMARGO *et al*, 1997). Diante destes estudos, e como a produção de TNF- α é um indicativo de ativação macrofágica, resolvemos verificar se o GIPL possuía a capacidade de induzir a produção de TNF- α . Observamos que o GIPL adicionado sozinho a macrófagos em cultura não é capaz de induzir a produção de TNF- α por estas células, ao contrário, reduz a produção induzida por LPS .

Como nós demonstramos, o GIPL é um potente redutor da produção de TNF- α e para excluir a possibilidade de que ele teria um efeito tóxico para a célula nós realizamos experimentos de toxicidade em que CMSP foram cultivadas na presença ou ausência desse glicoconjugado e não houve diferença entre o número de células mortas nos dois grupos estudados. Portanto, esta hipótese foi descartada e podemos inferir que o efeito observado é devido a uma regulação negativa da síntese desta citocina.

A seguir investigamos se a redução da produção de TNF- α era dependente da dose de GIPL utilizada. Observamos que ao aumentar a concentração do GIPL obtínhamos uma diminuição gradual da concentração do TNF- α . Além disso, nos primeiros experimentos realizados, estávamos expondo os macrófagos ao GIPL 3 horas antes do LPS para permitir um tempo de ação maior ao GIPL. Decidimos então usar GIPL simultaneamente ao LPS, 3

3 e 24 horas depois da adição do LPS e observamos que quando o GIPL foi dado simultaneamente ao LPS também se observa uma redução da produção de TNF- α ., mas se adicionarmos o GIPL 3 e 24 horas depois do LPS não há redução significativa da produção de TNF- α . Isto ocorre provavelmente porque como o LPS induz uma rápida produção de TNF- α , o GIPL adicionado algum tempo depois não interferiria mais no estímulo por LPS pois este já teria induzido os macrófagos a produzir TNF- α .

Assim nossos resultados mostraram que o GIPL têm a capacidade de reduzir a produção de TNF- α por macrófagos humanos estimulados por LPS. Outros estudos mostraram que outras glicolípidas têm a capacidade de aumentar a produção de TNF- α . Entre estas glicolípidas está o glicoesfingolípido de *P. falciparum* (SCHOFIELD & HACKET, 1993) e o GPI de *T. cruzi* (TACHADO *et al*, 1996; CAMARGO *et al*, 1997; GAZZINELLI *et al*, 1997). O próprio *T. cruzi* quando adicionado em culturas de células mononucleares induz à produção do TNF- α (VOORHIS *et al*, 1992). Entretanto foi mostrado que a molécula Ag C10, um glicosilfosfatidilinositol mucina, abundante na superfície do *T. cruzi*, também exibe a capacidade de suprimir a produção de TNF- α induzido pelo LPS como observado em nosso estudo (DE DIEGO *et al* 1997). Como o TNF- α é uma citocina envolvida na proteção contra *T. cruzi* tanto *in vitro* (MUÑOZ-FERNANDEZ *et al* 1992) quanto *in vivo* (LIMA *et al* 1997) por levar à ativação de macrófagos, os quais quando ativados possuem ampla atividade microbicida, podemos então, inferir que ao causar a redução na produção desta citocina, o GIPL pode favorecer a sobrevivência do parasito.

Visto o efeito do GIPL sobre a produção de TNF- α , decidimos verificar se a produção de outra citocina implicada na ativação macrofágica, a IL-12, era afetada da mesma forma

pelo GIPL. A IL-12 é uma citocina importante na proteção contra agentes infecciosos e induz as células NK e T a produzirem IFN- γ . Tem sido mostrado que esta citocina tem um papel essencial na cura e no estabelecimento da imunidade protetora contra diferentes espécies de *Leishmania* (SYPEK *et al*, 1993). A infecção de macrófagos por *T. cruzi in vitro* estimula a produção de IL-12 e a sua depleção torna os animais mais susceptíveis à infecção (ALIBERTI *et al*, 1996). Sabe-se ainda que a IL-12 está implicada na diferenciação das células Th1 e na resposta protetora contra parasitos intracelulares (BIROM & GAZINELLI, 1995). Em nossos estudos, verificamos que em culturas de macrófagos humanos estimulados com LPS e expostos ao GIPL havia uma diminuição da produção da IL-12 como foi observado com a produção de TNF- α nos resultados anteriores. Outros estudos mostraram o mesmo efeito, também em macrófagos humanos, com uma glicolípida de parasito, a Ag C10 uma mucina da âncora de GPI (DE DIEGO *et al* 1997). Considerando estes resultados, podemos inferir que um bloqueio na produção de IL-12 seria vantajoso para o parasito e como este efeito já foi mostrado antes com GPI (DE DIEGO *et al* 1997), parece provável, que mais moléculas da superfície do *T. cruzi* exerçam um papel similar ao GIPL na modulação da produção de IL-12.

A IL-8 é uma citocina que atua na sinalização para recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamatório e a sua produção foi mostrada em infecções por parasitos. Monócitos humanos infectados por promastigotas de *L. major* produzem grandes quantidades desta citocina (BADOLATO *et al* 1996), assim como células HeLa humanas infectadas por *T. gondii* (DENNEY *et al* 1999). Moléculas como o LPS, clinicamente conhecido por sua capacidade de causar uma reação inflamatória e de choque, também está associado à produção de IL-8 que gera um influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório (ISSEKUTZ,

et al, 1987). Diante da importância da produção desta citocina na etapa inicial da inflamação, investigamos a sua produção por macrófagos expostos ao GIPL. Em nosso estudo, o GIPL não foi capaz de reduzir a produção de IL-8, estimulada pelo LPS, diferente do observado para o TNF- α e a IL-12. Para excluir a possibilidade dessa ausência da inibição de IL-8 estar envolvida com o tempo de adição do GIPL, decidimos testar a adição do GIPL 3 horas antes, simultaneamente ao LPS e 3 horas depois da adição do LPS, sem que tenha sido observada qualquer redução significativa. Mostramos com isso que o GIPL não é capaz de inibir a produção de IL-8 por macrófagos humanos estimulados por LPS independentemente do momento em que ele é adicionado. Podemos então inferir que o GIPL atua na ativação macrofágica através da modulação da produção de TNF- α e IL-12, não estando envolvido no processo de migração de neutrófilos.

Tem sido sugerido que a indução de IL-10 é um importante mecanismo da evasão do parasito contra a ação microbicida de macrófagos, atuando dessa forma, como modulatória da função efetora de macrófagos (SILVA, 1992). Já foi mostrado que a IL-10 diminui a atividade leishmanicida de macrófagos humanos (VOULDOUKIS *et al*, 1997) e que na ausência de IL-10, o controle da replicação de *T. cruzi* é mais eficiente, com baixos níveis de parasitemia nos tecidos de camundongos geneticamente modificados para a não produção de IL-10 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996). Além disso, a IL-10 exerce um importante papel regulatório na resistência *in vivo* ao *T. cruzi*, inibindo a ação do IFN- γ na ativação de macrófagos e propiciando a sobrevivência do parasito (GAZZINELI *et al*, 1992). Por essa razão nós decidimos investigar a ação do GIPL sobre a indução desta citocina. Interessantemente, quando o GIPL é adicionado sozinho em cultura de macrófagos não induz IL-10 mas sim reduz a sua produção em culturas estimuladas com

LPS. Como a IL-10 tem um papel inibidor na produção de citocinas tipo Th1, este resultado parece contrário à nossa hipótese. Entretanto, alguns estudos mostram que a IL-10 pode atuar aumentando a expressão de citocinas Th1 em linfócitos T intestinais humanos (EBERT, 2000) e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (SANTIN & HERMONAT, 2000). Não podemos excluir que a redução da produção de IL-10 pelo GIPL poderia contribuir em uma redução da produção de citocinas Th1 o que favoreceria a sobrevivência do parasito.

Até o momento discutimos o efeito do GIPL sobre macrófagos e observamos que ele atua como um potente bloqueador da ativação macrófágica, o que propicia a sobrevivência do parasito. Em vista destes resultados, resolvemos verificar se o seu efeito também se estende aos linfócitos T. Para tanto, testamos duas citocinas produzidas por linfócitos, a IL-5 e o IFN- γ . Observamos que o GIPL não induz a produção de IFN- γ nem de IL-5, assim como não inibe sua produção induzida pela ativação do complexo CD3. Não excluí-se a hipótese de que o GIPL pode atuar de forma diferente em linfócitos estimulados por outras vias que não o TCR-CD3, já que estas não foram testadas. Estudos mostram que o GIPL não é capaz de induzir a secreção de IFN- γ por células NK (HINDS *et al*, 1999). Portanto, podemos concluir pelos dados disponíveis que o seu efeito se dá principalmente sobre macrófagos.

A próxima etapa deste estudo foi avaliar a ação do GIPL na proliferação celular de pacientes chagásicos crônicos. Estudos anteriores com cócultivo de CMSP e *T. cruzi* (VOORHIS, 1992.) e na presença de moléculas da superfície do *T. cruzi* como a enzima trans-sialidase (RIBEIRO *et al*, 2000) resultaram todos em proliferação de linfócitos. Ao contrário do observado com essas moléculas nós não observamos proliferação quando o GIPL foi adicionado sozinho e quando adicionado junto com extrato de epimastigota, não

foi capaz de inibir a proliferação. Em nossos resultados, o GIPL não foi capaz de estimular a imunidade celular nem de interferir na resposta antigênica quando apresentado primordialmente por macrófagos, podendo exercer um efeito diferente quando apresentado por outras células como células dendríticas.

Nossos dados sugerem que o GIPL pode atuar na supressão da ativação macrofágica, propiciando a sobrevivência do *T. cruzi* e o seu escape da resposta imunológica celular.

6 CONCLUSÃO

Após o estímulo pelo LPS, a exposição ao GIPL leva a redução do $\text{TNF}\alpha$, IL-12 e IL-10, indicando uma potente supressão da resposta macrofágica.

Considerando ainda, que o GIPL não estimula a produção de $\text{IFN}\gamma$ e IL-5 e a proliferação de linfócitos de pacientes chagásicos, sugerindo que não funciona como antígeno, concluímos que o GIPL parece estar envolvido na sobrevivência parasitária, através da supressão do macrófago.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, **84**:231-44, 1996.
- ACHE, A. Prevalência de infecção por *Trypanosoma cruzi* em bancos de sangue em Venezuela. **Inst. Med. Tropical**, **35**:443-448, 1993.
- AKHAVAN, D. Análise de custo e efetividade do programa de controle de Doença de Chagas no Brasil. **Relatório final. Fundação Nacional de Saúde. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento**, 1996.
- ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.**, **64**:1961-7, 1996.
- ANDRADE, Z. Patologia da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 12. 430 p. il. 201-224.

- BADOLATO, R.; SACKS, D.L.; SAVOIA, D.; MUSSO, T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. **Exp. Parasitol.**, **82**:21-6, 1996.
- BANCO MUNDIAL. Apéndice B. Carga global de la morbilidad, 1990. Informe sobre el Desarrollo Mundial 1993. **Investir en Salud**. Washington, DC: Banco Mundial, pp219-231, 1993.
- BELLIO, M.; LIVEIRA, A.C.; MERMELSTEIN, C.S.; CAPELLA, M.A.; VIOLA, J.P.; LEVRAUD, J.P.; DOSREIS, G.A.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L. Costimulatory action of glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*: increased interleukin 2 secretion and induction of nuclear translocation of the nuclear factor of activated T cells 1. **FASEB J.**, **13**:1627-36, 1999.
- BENTO, C.A.; MELO, M.B.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; PEÇANHA L.M. Glycoinositolphospholipids purified from *Trypanosoma cruzi* stimulate Ig production *in vitro*. **J. Immunol.**, **157**:4996-5001, 1996.
- BIRON, C.A.; GAZZINELLI, R.T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**:485-96, 1995.
- BODEL, P.& ATKINS, E. Release of endogenous pyrogen by human monocytes. **N. Engl. J. Med.**, **276**:1002-8, 1967.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

- CAMARGO, M.M.; ANDRADE, A.C.; ALMEIDA, I.C.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **J. Immunol.**, **159**:6131-9, 1997.
- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.**, **64**:128-34, 1996.
- CARDILLO, F.; FALCÃO, R.P.; ROSSI M.A.; MENGEL, J. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur. J. Immunol.**, **23**:2597-605, 1993.
- DE DIEGO, J.; PUNZON, C.; DUARTE, M.; FRESNO, M. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. **J. Immunol.**, **159**:4983-9, 1997.
- DENNEY, C.F.; ECKMANN, L.; REED, S.L. Chemokine secretion of human cells in response to *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun.**, **67**:1547-52, 1999.
- DORTA, M.L.; FERREIRA, A.T.; OSHIRO, M.E.; YOSHIDA, N. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **73**:285-9, 1995.
- EBERT, E.C. IL-10 enhances IL-2-induced proliferation and cytotoxicity by human intestinal lymphocytes. **Clin. Exp. Immunol.** **119**:426-32, 2000.

FRASCH, A. C. Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and the mammalian host. **Parasitology**, **108 Suppl**:S37-44, 1994.

FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NUNES, M.P.; CORTE-REAL, S.; SOARES, M.P.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; DOSREIS, G.A.; Proapoptotic activity of a *Trypanosoma cruzi* ceramide-containing glycolipid turned on in host macrophages by IFN-gamma. **J. Immunol.**, **161**:4909-16, . 1998.

GARCIA; AZAMBUJA. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the vector. **Parasitology Today**, **7**:240-244, 1991.

GAZZINELLI, R.T.; CAMARGO, M.M.; ALMEIDA, I.C.; MORITA, Y.S.; GIRALDO, M.; ACOSTA-SERRANO, A.; HIENY, S.; ENGLUND, P.T.; FERGUSON, M.A.; TRAVASSOS, L.R.; SHER, A. Identification and characterization of protozoan products that trigger the synthesis of IL-12 by inflammatory macrophages. **Chem. Immunol.**, **68**:136-52, 1997.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES S.,L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, **22**:2501-6, 1992.

GAZZINELLI, R.T.; TALVANI, A.; CAMARGO, M.M.; SANTIAGO, H.C.; OLIVEIRA, M.A.; VIEIRA, L.Q.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.; SILVA, J.S. Induction of

cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa.

Braz. J. Med. Biol. Res., **31**:89-104, 1998.

GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J. Immunol.**, **157**:798-805, 1996.

GOMES, N.A.; PREVIATO, J.O.; ZINGALES, B.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; DOSREIS G.A. Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. Assignment of the T cell-suppressive determinant to the ceramide domain. **J. Immunol.**, **156**:628-35, 1996.

HINDS, L.B.A., PREVIATO, L.M.; PREVIATO, J.º; VOS, Q.; MOND, J.J.; PEÇANHA, L.M.T. Modulation of B-Lymphocyte and NK cell activities by glycoinositolphospholipid purified from *T. cruzi*. **Infect. Immunity**, **67**: p.6177-6180, 1999.

HOFFMANN, P.; HEINLE, S.; SCHADE, U.F.; LOPPNOW, H.; ULMER, A.J.; FLAD, H.D.; JUNG, G.; BESSLER, W.G. Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic lipopeptide analogues. **Immunobiology**, **177**:158-70, 1988.

- LIMA, E.C.; GARCIA, I.; VICENTELLI, M.H.; VASSALLI, P.; MINOPRIO, P.
Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect. Immun.**, **65**:457-65, 1997.
- LO, S.K.; BOVIS, L.; MATURA, R.; ZHU, B.; HE, S.; LUM, H.; TURCO, S.J.; HO, J.L.
Leishmania lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. **J. Immunol.**, **160**:1857-65, 1998.
- MARIN-NETO, J.A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, A.V.L. Forma crônica cardíaca. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 15. 430 p. il. p. 266-291.
- MCCONVILLE, M.J.; COLLIDGE, T.A.; FERGUSON, M.A.; SCHNEIDER, P. The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. **J. Biol. Chem.**, **268**:15595-604, 1993.
- MCCONVILLE, M.J & RALTON, J.E. Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. **Behring Inst. Mitt.**, **Mar**;(99):34-43, 1997.
- MINOPRIO, P.; ITOHAR, A.S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A.
Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol. Ver.**, **112**:183-207, 1989.

- MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; DE WAAL MALEFYT, R.; VIEIRA, P.; MOSMANN
TR. Interleukin-10. **Annual Rev. Immunol.**, **11**:165-90, 1993.
- MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Synergism between
tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the
killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent
mechanism. **Eur. J. Immunol.**, **22**:301-7, 1992.
- PREVIATO, J.O.; GORIN, P.A.; MAZUREK, M.; XAVIER, M.T.; FOURNET, B.;
WIERUSZESK, J.M.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Primary structure of the
oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of
Trypanosoma cruzi. **J. Biol. Chem.**, **265**:2518-26, 1990.
- PROUDFOOT, L.; SCHNEIDER, P.; FERGUSON, M.A.; MCCONVILLE, M.J.
Biosynthesis of the glycolipid anchor of lipophosphoglycan and the structurally related
glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. **Biochem. J.**, **308**:45-55, 1995.
- REED, S.G.; BROWNELL, C.E.; RUSSO, D.M.; SILVA, J.S.; GRABSTEIN, K.H.;
MORRISSEY, P.J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J.**
Immunol., **153**(7):3135-40, 1994.
- REUNIÃO DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS. Validade do
conceito de forma indeterminada de doença de chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**
18:46,1985.
- RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; RENIA, L.; AUGUSTO FRAGATA
FILHO, A.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. Chagasic patients develop a

type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Parasite Immunol.**, **22(1)**:49-53, 2000.

RIMOLDI, M.T.; TENNER, A.J.; BOBAK, D.A.; JOINER, K.A. Enhanced invasion of mononuclear phagocytes by serum-treated *Trypanosoma cruzi* is due to Clq. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **83 Suppl 1**:456-8, 1988.

SANTIN, A.D.; HERMONAT, P.L.; RAVAGGI, A.; BELLONE, S.; PECORELLI, S.; ROMAN, J.J.; PARHAM, G.P.; CANNON, M.J. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. **J. Virol.**, **74**:4729-37, 2000.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D.; PEREIRA, M.E.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of *Trypanosoma* trans-sialidase. **Annual Ver. Microbiol.**; **48**:499-523, 1994.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 3. 430 p. il. P. 21-40.

SCHMUNNIS, G. Trypanosomíase Americana e seu impacto na saúde pública das américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap.1. 430 p. il. P. 1-15.

SCHOFIELD, C.J. ; DIAS, J.C.P. A cost benefit analysis of Chagas Disease control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**:285-295, 1991.

- SCHOFIELD, L. & HACKETT, F. .Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. **J. Exp. Med.**, **177**:145-53, 1993.
- SILVA, J.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D. REED, S.G. .Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, **175**:169-74, 1992.
- SILVEIRA, A.C.; REZENDE, D.F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27** supl. 3:5-16, 1994.
- STEEL, D.M.; WHITEHEAD, A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. **Immunol. Today**, **15**:81-8, 1994.
- SYPEK, J.P.; JACOBSON, S. VORYS, A.; WYLER, D.J. Comparison of gamma interferon, tumor necrosis factor, and direct cell contact in activation of antimycobacterial defense in murine macrophages. **Infect. Immun.**, **61**:3901-6, 1993.
- TACHADO, S.D.; GEROLD, P.; MCCONVILLE, M.J.; BALDWIN, T.; QUILICI, D.; SCHWARZ. R.T., SCHOFIELD, L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. **J. Immunol.**, **156**:1897-1907, 1996.

- TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, 71:1117-30, 1992.
- VAN VOORHIS W.C. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. **J. Immunol.**, 148:239-48, 1992.
- VESPA, G.N.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.**, 62:5177-82, 1994.
- VOULDOUKIS, I.; BECHEREL, P.A.; RIVEROS-MORENO, V.; AROCK, M.; DA SILVA, O.; DEBRE, P.; MAZIER, D.; MOSSALAYI, M.D. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **Eur. J. Immunol.**, 27:860-5, 1997.
- WILSON, C.B. & REMINGTON, J.S. Activity of human blood leukocytes against *Toxoplasma gondii*. **J. Infect. Dis.**, 140:890-5, 1979.
- WIRTH, J.J.; KIERSZENBAUM, F. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, 133:460-4, 1984.
- WHO. Control of chagas'disease. **Report of a WHO expert commitee. WHO Technical Report Series.N811**, Geneva, 95p, 1991.

- YOSHIDA, N.; DORTA, M.L.; FERREIRA A.T.; OSHIRO, M.E.; MORTARA R.A.; ACOSTA-SERRANO, A.; FAVORETO JUNIOR, S. Removal of sialic acid from mucin-like surface molecules of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes enhances parasite-host cell interaction. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **84**:57-67, 1997.
- YOSHIDA, N; MORTARA, R.A.; ARAGUTH, M.F.; GONZALEZ, J.C.; RUSSO, M. Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, **57**:1663-7, 1989.
- ZAHEDI, K.; TEBO, J.M.; SIRIPONT, J.; KLIMO, G.F.; MORTENSEN, R.F. Binding of human C-reactive protein to mouse macrophages is mediated by distinct receptors. **J. Immunol.**, **142**:2384-92, 1989.