

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

A INFECÇÃO DAS CÉLULAS B POR *Trypanosoma cruzi* RESULTA EM ATIVAÇÃO DA
CASPASE-7, CLIVAGEM PROTEOLÍTICA DA PLC γ 1 E MORTE CELULAR

Marlus Alves dos Santos

Uberlândia-MG
Julho-2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

A INFECÇÃO DAS CÉLULAS B POR *Trypanosoma cruzi* RESULTA EM ATIVAÇÃO DA
CASPASE-7, CLIVAGEM PROTEOLÍTICA DA PLC γ 1 E MORTE CELULAR

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor.

Discente: Me. Marlus Alves dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida de
Souza

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva

Uberlândia-MG

Julho-2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S237i
2017 Santos, Marlus Alves dos, 1978
A infecção das células B por *Trypanosoma cruzi* resulta em ativação da Caspase-7, clivagem proteolítica da PLC γ 1 e morte celular / Marlus Alves dos Santos. - 2017.

71 p. : il.

Orientadora: Maria Aparecida de Souza.

Coorientador: Cláudio Vieira da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. Chagas, Doença de - Teses. I. Souza, Maria Aparecida de. II. Silva, Cláudio Vieira da, 1972-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Marlus Alves dos Santos

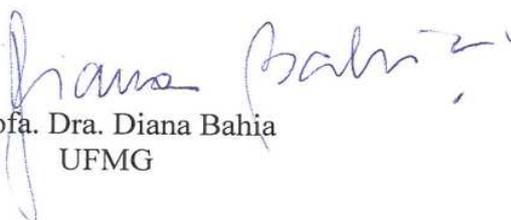
“A INFECÇÃO DAS CÉLULAS B POR *Trypanosoma cruzi* RESULTA EM ATIVAÇÃO DA CASPASE-7, CLIVAGEM PROTEOLÍTICA DA PLC γ 1 E MORTE CELULAR”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 31 de julho de 2017.


Prof. Dra. Diana Bahia
UFMG


Prof. Dra. Angelica de Oliveira Gomes
UFTM


Prof. Dra. Neide Maria da Silva
ICBIM/UFU


Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo
ICBIM/UFU


Prof. Dra. Maria Aparecida de Souza – orientadora
ICBIM/UFU

DEDICATÓRIA

À minha amada filha, Lívia Mariane, quem me concedeu o título de pai.

À minha amada esposa, Liviane, por todo apoio, paciência, companheirismo e amor.

À minha amada mãezinha, Maria Conceição, pelo incentivo e ajuda.

Todos que participaram da minha jornada.

Por fim, ao meu pai, a quem dedico este verso:

“Father into your hands, I commend my spirit

Father into your hands, why have you forsaken me?

In your eyes, forsaken me

In your thoughts, forsaken me

In your heart, forsaken me...” (System of a Down)

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”

Trem Bala (Ana Vilela)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, por todo conhecimento e formação intelectual que adquiri;

À CAPES, pelo auxílio financeiro durante o doutorado;

À Professora Dra. Maria Aparecida de Souza, pela oportunidade de ingressar no Programa, por permitir que sigamos nossas próprias ideias, sempre disponível para nos ajudar;

Ao Professor Dr. Marcelo José Barbosa Silva, por toda parceria e colaboração na execução deste trabalho;

Ao Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, Dra. Daiana Silva Lopes e Dra. Michelle A. Ribeiro de Freitas, pelas preciosas considerações na banca de qualificação;

Ao meu querido Laboratório de Tripanosomatídeos-LATRI, lugar onde certo dia um Enfermeiro confuso entrou e se tornou um pesquisador apaixonado por ciência;

À minha querida família LATRI por ter me acolhido, pela amizade, parceria, ajuda e companheirismo, amo TODOS de coração;

À Dra. Ana Cláudia Arantes Marques Pajuaba, pela colaboração e disponibilidade nas análises por citometria de fluxo;

À minha querida amiga Mariane, técnica responsável pelo microscópio confocal da UFU, pela preciosa ajuda na captação e análise das imagens;

Todos que participaram deste Doutorado direta ou indiretamente.

E por fim, ao meu querido Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva, meu ídolo, meu exemplo vivo de cientista, um pensador convicto de seus ideais e crítico das injustiças, receba o meu MUITO OBRIGADO!

LISTA DE ABREVIACÕES

%	Porcentagem
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar
Abs	Absorbância
ADP	Adenosina difosfato
AE	Amastigotas extracelulares
AKT	Proteína quinase B
ATP	Adenosina trifosfato
cm^2	Centímetros quadrados
CO_2	Dióxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamino-2-fenilenoindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
h	Horas
HEPES	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
IgG	Imunoglobulina G
IP3	Trifosfato de inositol
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
min	Minutos
mL	Mililitros
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (alvo da rapamicina em mamíferos)
nm	Nanmetro

°C	Graus Celsius
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PGN	Solução contendo PBS, 0,15% de gelatina e 0,1% azida (NaN ₃)
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3-quinase)
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato)
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato)
PKC	<i>Protein kinase C</i> (proteína quinase C)
PLC	Fosfolipase C
PPD	Parafenilenodiamina
RAS	<i>Rat sarcoma virus</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio (SDS) eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)
SFB	Soro fetal bovino
TCT	Tripomastigotas de cultura de tecidos
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i> (Tetrametil rodamina isotiocianato)
UV	Ultravioleta
VERO	Fibroblastos de rim de macaco verde da África

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos gerais sobre o desenvolvimento e funções das células B	24
Figura 2. Formas de desenvolvimento e ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> nos hospedeiros invertebrados e vertebrados	29
Figura 3. Detecção de células B infectadas por <i>T. cruzi</i> em modelo animal de doença de Chagas aguda.....	43
Figura 4. <i>T. cruzi</i> infecta células B humanas <i>in vitro</i>	44
Figura 5. <i>T. cruzi</i> pode ser visualizado no interior das células B por microscopia de luz e microscopia confocal.....	45
Figura 6. U73122 potencializa a invasão das células B por <i>T. cruzi</i> de linfócitos B por despolimerizar a actina cortical	48
Figura 7. qPCR da expressão gênica relativa do RNAm da proteína Cofilina.....	49
Figura 8. <i>T. cruzi</i> afeta o citoesqueleto de actina cortical das células B durante a infecção...	52
Figura 9. <i>T. cruzi</i> ativa Caspase-7 e induz a clivagem proteolítica da Fosfolipase C γ 1 durante a invasão das células B	55
Figura 10. Células B infectadas por <i>T. cruzi</i> sofrem apoptose tardia e morte celular.....	58
Figura 11. Resumo Gráfico	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Moléculas de superfície (CD) preferencialmente expressas por células B22

Tabela 2 - Inibidores das vias de sinalização36

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a análise dos níveis transcricionais relativos por PCR em tempo real38

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA	12
RESUMO EM INGLÊS (ABSTRACT)	13
1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA	14
1.1. Aspectos gerais sobre a biologia, desenvolvimento e função das células B	14
1.1.1. Desenvolvimento e maturação das células B	14
1.1.2. O centro germinativo	16
1.1.3. Imunoglobulinas, estrutura e diversidade	18
1.1.4. Células B com funções especiais	19
1.1.5. Moléculas de superfície das células B	21
1.1.6. As células B como alvo e reservatório de patógenos	22
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> – Aspectos gerais	25
1.2.1. Doença de Chagas	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Aspectos éticos e legais	30
3.2. Camundongos	31
3.3. Anticorpos e reagentes.....	31
3.4. Células e parasitas	32
3.5. Ensaio de invasão <i>in vivo</i>	33
3.6. Ensaio de invasão <i>in vitro</i>	33
3.7. Microscopia de luz.....	34
3.8. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	34

3.9. Citometria de fluxo.....	35
3.10. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	37
3.11. Desenho, validação dos iniciadores e quantificação dos níveis transcricionais relativos da Cofilina por qPCR	37
3.12. Quantificação de $[Ca^{2+}]$ citosólico em células B.....	38
3.13. Ensaio de ativação de Rac e RhoA GTPases (G-LISA™).....	39
3.14. Ensaio de multiplicação de parasitas e células B	39
3.15. <i>Western blotting</i>	39
3.16. Análise estatística	40
4. RESULTADOS	41
4.1. <i>T. cruzi</i> infecta células B <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	41
4.2. U73122, um inibidor de Fosfolipase C, aumenta a infecção das células B por <i>T. cruzi</i> por despolimerizar o citoesqueleto de actina.....	46
4.3. Infecção por <i>T. cruzi</i> induz polimerização da actina no sítio de invasão e despolimerização geral do citoesqueleto de actina.....	50
4.4. Infecção por <i>T. cruzi</i> resulta na ativação da Caspase-7 e na clivagem proteolítica da Fosfolipase γ 1 em células B.....	53
4.5. Células B não suportam o parasitismo e sofrem morte celular	56
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8. ANEXOS	71

RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA

As células B contribuem para imunidade de diversas maneiras, tais como: apresentação de antígenos aos linfócitos T, produção de citocinas, secreção de imunoglobulinas envolvidas na opsonização, fagocitose ou lise celular de patógenos por meio do sistema complemento. Ainda, as células B são responsáveis por componentes essenciais da resistência contra patógenos intracelulares. *Trypanosoma cruzi* é um parasita intracelular, causador da doença de Chagas, que consegue evadir da resposta humoral do hospedeiro induzindo a diminuição da quantidade de células B, principalmente aquelas especializadas no combate ao parasita. Dessa forma, ocorre uma elevada parasitemia, o indivíduo torna-se suscetível à doença e o parasita se estabelece cronicamente no hospedeiro. Apesar do protagonismo das células B no sistema imunológico, sua relevância na patogenia da doença de Chagas é ofuscada pela ênfase que se tem dado às pesquisas com células T nesse contexto. Este estudo mostra claramente que *T. cruzi* infecta células B, evento ainda não demonstrado por estudos prévios. O parasita interage com o citoesqueleto de actina dessas células causando polimerização no sítio de entrada, seguida por despolimerização geral. Ainda, a inibição farmacológica da Fosfolipase C intensificou a invasão do parasita que, por sua vez, ativa a Caspase-7 e a clivagem proteolítica da Fosfolipase C γ 1, resultando em morte das células B por não suportarem o parasitismo.

Palavras-chave: Células B, *Trypanosoma cruzi*, Caspase-7, Fosfolipase C, apoptose, morte celular.

RESUMO EM INGLÊS (ABSTRACT)

B lymphocytes contribute to immunity in several ways, like presentation of antigen to T cells, secretion of cytokines and the unique producer immunoglobulin cell. Publications have considered B lymphocytes important for the resistance to intracellular pathogens. *Trypanosoma cruzi*, an intracellular parasite and etiological agent of Chagas' disease, sabotages humoral response by depletion of B lymphocytes, resulting in increased parasitemia and susceptibility to disease. However, the role of B lymphocytes in the pathogenesis of Chagas' disease has been overshadowed by the emphasis on T cells research. This investigation demonstrated that *T. cruzi* can effectively infect B lymphocytes inducing actin polymerization at the site of parasite invasion followed by a general actin depolymerization. Phospholipase C inhibition potentiates the parasitism of B lymphocytes. Moreover, *T. cruzi* infection induces proteolytic cleavage of Phospholipase C-gamma1 and Caspase-7 activation in B lymphocytes. Notably, B lymphocytes do not support parasite infection and undergo to cell death.

Keywords: B lymphocytes, *Trypanosoma cruzi*, Caspase-7, Phospholipase c, apoptosis, cell death.

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

1.1. Aspectos gerais sobre a biologia, desenvolvimento e função das células B

A descoberta e a caracterização das células B ocorreram entre os anos 1960 e meados de 1970, apesar de haver algumas indicações funcionais da existência dessas células desde 1890 (COOPER, 2015). Estudos conduzidos em modelos animais (aves, roedores e coelhos), avaliações clínicas de pessoas com imunodeficiências assim como os avanços na tecnologia de caracterização das moléculas de superfície resultaram no delineamento experimental de duas linhagens celulares distintas, uma sendo responsável pela imunidade celular e a outra pela resposta humoral, as células T (*Thymus-derived*) e as células B (*Bursal/Bone marrow-derived*), respectivamente (COOPER, 2015; LEBIEN; TEDDER, 2008). Desde então, as células B têm sido tradicionalmente associadas à imunidade humoral, mas atualmente sabe-se que elas são igualmente relevantes para a resposta imune celular, ativando células T via apresentação de antígenos, coestimulação e produção de citocinas; também atuam na defesa contra microorganismos, inflamação tecidual e como células reguladoras que modulam a resposta imune de modo geral (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

O desenvolvimento das células B em mamíferos abrange vários estágios contínuos, começando em tecidos linfoides primários (fígado fetal e medula óssea), percorrendo etapas subsequentes de maturação funcional em órgãos linfoides secundários (linfonodos e baço) para finalmente se diferenciarem em células produtoras de anticorpos e de memória (LEBIEN; TEDDER, 2008).

1.1.1. Desenvolvimento e maturação das células B

Em mamíferos, as células B iniciam seu desenvolvimento no fígado fetal e na medula óssea a partir de células precursoras hematopoiéticas (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; MADDALY et al., 2010). Durante a vida embrionária, a medula óssea é semeada por células tronco hematopoiéticas (HSC) originárias do fígado fetal, elas se diferenciam em células pró-B nos estágios iniciais de desenvolvimento, passando por processos de rearranjos funcionais nos genes codificadores de imunoglobulinas (COOPER, 2015; HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; MADDALY et al., 2010; PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013). No fígado fetal e na medula óssea, tais rearranjos ocorrem nos segmentos gênicos V (variável), D (diversidade) e J (junção) da cadeia pesada (H) e nos segmentos V e J da

cadeia leve (L), de modo a agrupá-los em fragmentos contíguos, resultando em repertórios variados de rearranjos funcionais VDJ_H e VJ_L codificadores do receptor BCR, que diversificam e capacitam as células B a reconhecerem mais de 5×10^3 antígenos diferentes (LEBIEN; TEDDER, 2008; PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013). Cada rearranjo ocorre em um único cromossomo e somente envolve o segundo cromossomo se o primeiro rearranjo for improdutivo (MADDALY et al., 2010).

São as células pró-B, que não expressam pré-BCR nem imunoglobulinas (Ig) de superfície, que dão origem às células pré-B (LEBIEN; TEDDER, 2008). A descoberta da cadeia leve substituta (SLCs) foi fundamental para esclarecer os mecanismos reguladores do desenvolvimento das células B iniciais; a SLC é um heterodímero formado por duas proteínas distintas a $\lambda 5$ e a V_{preB} , que se emparelham com a cadeia pesada- μ para formar o pré-BCR, o que caracteriza o início do estágio de desenvolvimento das células pré-B (LEBIEN; TEDDER, 2008; MADDALY et al., 2010). O pré-BCR gera sinais que desligam a expressão do gene RAG (exclusão alélica), prevenindo o rearranjo de uma segunda cadeia pesada pelo cromossomo alelo e induzindo proliferação; em seguida o gene RAG é reativado para iniciar o rearranjo V-J da cadeia leve, cadeias leves κ ou λ rearranjadas satisfatoriamente substituem a SLC do receptor pré-BCR, emparelhando como a cadeia pesada- μ para formar IgM (Figura 1 A) (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013). O processamento diferencial do RNA assim como a poliadenilação dos transcritos da cadeia pesada primária permitem que as células B expressem simultaneamente IgM e IgD na superfície da membrana (MADDALY et al., 2010).

Após saírem da medula óssea, as células B imaturas se instalam no baço e linfonodos sendo denominadas como células B transicionais (T1 e T2); a partir daí elas já respondem a antígenos do tipo 1 (lipopolissacarídeos), independentes de células T, produzindo rapidamente anticorpos sem necessidade de recorrer ao complexo MHCII. A seguir as células B transicionais se diferenciam em células B da zona marginal ou células B foliculares, isso vai depender de fatores como: sinais recebidos pelo receptor BCR, fator ativador de células B (BAFF) assim como fatores de transcrição (NOTCH2 e BTK). Células B da zona marginal ficam retidas no baço, enquanto as foliculares recirculam e povoam outros tecidos linfoides secundários (linfonodos, tonsilas, etc.). A maioria das células B maduras reside nos folículos linfoides dos linfonodos e do baço, onde elas reconhecem e respondem a antígenos externos ligados às células dendríticas foliculares, de modo dependente das células T, resultando em proliferação celular assim como diferenciação em plasmócitos (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; LEBIEN; TEDDER, 2008).

As principais classes de células B maduras com funções distintas são as células B-1, células B foliculares (FO) e as células B da zona marginal (MZ) (NUTT et al., 2015). As células B-1 surgem de progenitores no fígado fetal e distinguem-se das FO pelo fenótipo, localização anatômica, capacidade de auto renovação e produção de anticorpos naturais (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016). Células B-1 residem nas cavidades peritoneal, pleural e também em mucosas, sendo subdivididas em dois grupos, B-1a (CD5⁺) e B-1b (CD5⁻); as células B-1a produzem anticorpos naturais (IgM e IgA) proporcionando proteção inata contra antígenos independentes de células T, carboidratos e fosfolípidios presentes em bactérias comensais; já as células B-1b proporcionam proteção adaptativa de longo prazo contra polissacarídeos e outros antígenos do tipo 2 (independentes de células T) durante a infecção (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; LEBIEN; TEDDER, 2008).

Células B da MZ, encontradas no seio marginal do baço, desenvolvem-se a partir de células B transitórias e representam a primeira linha de defesa contra patógenos presentes no sangue, tais como bactérias encapsuladas, diferenciando-se em plasmócitos extrafoliculares e produzindo anticorpos IgM polirreativos que promovem a eliminação desses patógenos; as células B da MZ são capazes de reconhecer tanto antígenos dependentes quanto os independentes (carboidratos e fosfolípidios) de células T, IgM produzidas por elas cobrem o espaço temporal até o início da produção de IgGs específicas pelas células B FO (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; LEBIEN; TEDDER, 2008; PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013). Células B FO são as células B convencionais da resposta imune adaptativa, surgem a partir das células B transitórias (T2) residindo no baço e linfonodos; embora participem da resposta imune independente das células T produzindo IgM, são primeiramente responsáveis pela geração de anticorpos IgG de alta afinidade com a ajuda de células T, fundamental para a imunidade humoral clássica fornecendo proteção contra infecções e após vacinas (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; NUTT et al., 2015).

1.1.2. O centro germinativo

As células B que se submeteram satisfatoriamente à recombinação V(D)J e que expressam receptores BCR funcionais migram como células naïve da medula óssea para órgãos linfoides secundários, como os linfonodos (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015). Os linfonodos possuem folículos, constituídos principalmente de células B IgM⁺IgD⁺ naïve, separados por uma região interfolicular; as áreas ricas em células T (zona das células T)

margeiam esses folículos (DE SILVA; KLEIN, 2015). Primeiramente, as células B são ativadas por antígenos exógenos no interior do folículo, em seguida elas migram para a periferia próxima à zona das células T, onde proliferam e são completamente estimuladas após interagirem com as células T, que se tornam células T_{FH} e migram para o interior do folículo (DE SILVA; KLEIN, 2015). Algumas células B ativadas migram para os cordões medulares dos linfonodos e se diferenciam em plasmablastos de vida curta, que secretam anticorpos de baixa afinidade; outro grupo de células B ativadas e selecionadas, após competirem por sinais das células T, darão origem aos centros germinativos (CG), migrando da região interfolicular para o centro do folículo (Figura 1 B) (DE SILVA; KLEIN, 2015).

Os CG são estruturas histológicas transitórias que se formam nos órgãos linfoides periféricos em resposta a antígenos dependentes de células T (DE SILVA; KLEIN, 2015), dedicam-se à geração e seleção de células B que produzem anticorpos de alta afinidade (plasmócitos) e células B de memória (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015; DE SILVA; KLEIN, 2015). Sua estrutura é constituída de dois compartimentos histológicos e funcionais bem delimitados, a zona escura e a zona clara (Figura 1 B). Na zona escura as células B, nomeadas centroblastos (ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016), proliferam intensamente e sofrem hipermutação somática (SHM), um mecanismo genético que introduz pontos de mutações nos seguimentos gênicos codificadores da região variável nas cadeias leve e pesada, resultando em mudanças na imunoglobulina expressa que possui afinidade/especificidade alterada a antígenos (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015; DE SILVA; KLEIN, 2015; HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016).

Após a expansão proliferativa e SHM na zona escura, as células B deslocam-se para a zona clara onde a atividade proliferativa é mais baixa (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015). Na zona clara os centrócitos sofrem mudança de classe por recombinação (CSR), somente as células que possuem alta afinidade por antígenos são selecionadas para sobreviver, interagindo com células dendríticas foliculares e células T_{FH} (Figura 1 B), também encontradas neste compartimento, que fornecem estímulos reguladores desse processo (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015; ZHANG; GARCIA-IBANEZ; TOELLNER, 2016).

As células T_{FH} auxiliam as células B de sete formas distintas: induzindo proliferação, sobrevivência, diferenciação em plasmócitos, SHM, CSR, adesão e atração (CROTTY, 2015). O CG é um ambiente pró-apoptótico, logo os sinais de sobrevivência enviados pelas células T_{FH} são cruciais para a manutenção da viabilidade e proliferação das células B; a IL-4 produzida por células T_{FH} promove a sobrevivência das células B do CG ligando-se ao

receptor dessas células. Além disso, a SHM é um processo fundamental para a biologia do CG e seu propósito principal é facilitar a maturação por afinidade das células B por meio de rounds sequenciais de mutação e seleção no gene de imunoglobulinas (CROTTY, 2015).

A enzima desaminase induzida por ativação (AID) induz danos ao DNA dos genes codificadores de imunoglobulinas, os quais são convertidos em mutações pelas enzimas de reparo do DNA; os sinais que induzem a expressão de AID pelas células B não são completamente compreendidos, mas CD40L, IL-4 e IL-21 parecem contribuir em diferentes proporções para a mistura primária de sinais das células T_{FH} que controlam a proliferação, SHM, CSR e diferenciação das células B (CROTTY, 2015). Finalmente, outro componente quimioatrativo das células T_{FH} é o ligante CXCL13 que se liga ao receptor CXCR4 das células B do CG, promovendo a colocalização e o confinamento no CG (CROTTY, 2015).

O resultado das reações que ocorrem no CG é a geração de células B de memória e plasmócitos produtores de anticorpos de alta afinidade e diferentes classes isotípicas; porém o processo de maturação das células B não percorre um trajeto unidirecional entre os dois compartimentos, podem ocorrer ciclos de reentrada, em que as células B do CG após passarem por processos seletivos na zona clara, retornam à zona escura para *rounds* extras de SHM e divisão celular (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015; DE SILVA; KLEIN, 2015; HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

Os CG são os centros ativos de proliferação, mutação e produção de células B antígeno-específicas em larga escala, é onde o receptor BCR adquire alta afinidade por antígenos e expande seu repertório de epítopos que pode reconhecer, seja por processo de mutações ou seleção por células T CD4⁺; é quase que exclusivamente via CG que as células B desenvolvem memória imunológica na forma de plasmócitos de vida longa e células B de memória, para isso os CG dependem das células T CD4⁺ para seu desenvolvimento, manutenção e para a produção de plasmócitos (CROTTY, 2015).

1.1.3. Imunoglobulinas, estrutura e diversidade

Como uma das principais funções das células B é a produção de imunoglobulinas, é importante destacar algumas características dessas moléculas de defesa e enumerar os diferentes isotipos ou classes. Imunoglobulinas ou anticorpos são proteínas glicosiladas presentes na superfície das células B, atuando como receptores de antígenos (BCR), ou são secretadas no espaço extracelular onde se ligam e neutralizam os antígenos alvos (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

A clivagem enzimática de anticorpos através da papaína forneceu as primeiras evidências estruturais da molécula, produzindo um fragmento da cadeia pesada que pôde ser cristalizado devido à sua homogeneidade (Fragmento cristalizável-Fc; Figura 1 C, área destacada em azul); e uma porção não homogênea da cadeia pesada, que permaneceu aderida a uma cadeia leve, retendo sua capacidade de se ligar a antígenos (Fragmento de ligação a antígenos-Fab) (COOPER, 2015). Assim, a estrutura dos anticorpos é constituída de quatro cadeias proteicas: duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas umas às outras por pontes dissulfeto (Figura 1 C). A região N-terminal das cadeias pesada e leve são variáveis e correspondem ao sítio de ligação aos antígenos, determinando sua especificidade (Figura 1 C, região destacada em verde).

Em humanos, existem cinco isotipos ou classes de anticorpos (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE) que se distinguem uns dos outros de acordo com a região C terminal da cadeia pesada, que é constante e não participa da ligação aos antígenos, sendo importante para a função efetora dos anticorpos na eliminação de patógenos. Ainda, existem quatro subclasses ou isotipo do anticorpo IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), sendo a IgG1 o isotipo mais predominante e de vida média maior (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

Os anticorpos exercem suas funções efetoras de diferentes formas: neutralizam patógenos intracelulares ligando-se a eles antes de invadirem as células; ativam macrófagos e outras células imunológicas por se ligarem a receptores Fc (FcRs), que reconhecem as regiões constantes de classes específicas de anticorpos; também ativam a via clássica do sistema complemento por se ligarem a C1q. O mecanismo efetor que será ativado vai depender do isotipo da cadeia pesada e da afinidade que o receptor Fc tem por ela, resultando em efeitos ativadores ou inibitórios nas células (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

1.1.4. Células B com funções especiais

Além de serem protagonistas da imunidade humoral, as células B contribuem diretamente com a reposta imune celular de três maneiras diferentes: atuando como células apresentadoras de antígenos ativando células T, como células efetoras produzindo citocinas inflamatórias e como células B reguladoras que secretam IL-10 modulando a resposta imune (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; LEBIEN; TEDDER, 2008).

Antígenos capturados pelo receptor BCR são internalizados e degradados nos compartimentos endossomais em peptídeos simples, que emergem na superfície celular complexados com MHC-I e II, esses fragmentos são apresentados aos linfócitos T CD4 e

CD8. De modo similar às células dendríticas, as células B expressam citocinas (IL-6, IL-10 e IFN- γ) e moléculas coestimulatórias necessárias à ativação das células T, B7 e CD40 que se ligam a receptores coestimulatórios das células T, CD28 e CD40L respectivamente (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; LEBIEN; TEDDER, 2008).

Durante a resposta imune, algumas células B adquirem a habilidade de produzir citocinas efetoras com propriedades inflamatórias, por exemplo, IFN- γ , TNF- α e IL-17. IFN- γ e TNF- α tem efeitos nocivos ao endotélio e células epiteliais, estando envolvidas na rejeição de enxertos e doenças inflamatórias; a IL-17 estimula a produção de citocinas e quimiocinas pelo endotélio, epitélio e fibroblastos, promovendo infiltração de neutrófilos e inflamação (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

Plasmablastos são células efetoras geradas rapidamente, apesar de se dividirem e terem potencial migratório possuem vida curta; podem se diferenciar em plasmócitos e são responsáveis pela produção inicial de anticorpos (NUTT et al., 2015). Os plasmócitos são células que não se dividem e secretam grandes quantidades de anticorpos, sendo geradas nos CG a partir da diferenciação terminal de linhagens de células B, como plasmablastos (DE SILVA; KLEIN, 2015); são encontrados em múltiplos órgãos linfoides, mas em casos de doenças podem ser observados em órgãos não linfoides (NUTT et al., 2015). A medula óssea abriga a maioria dos plasmócitos em indivíduos saudáveis, o recrutamento e a permanência dessas células na medula óssea requer a expressão do receptor CXCR4, instalando-se em nichos de sobrevivência e sendo mantidos por células estromais e eosinófilos, que secretam CXCL12 assim como fatores de sobrevivência (APRIL) e citocinas (TNF e IL-6), também se associando a essas células por meio de VLA4 (ligante de VCAM1), CD44, CD28 e CD93; plasmócitos produzem anticorpos que mantém a memória sorológica independente de novas exposições ao antígeno (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; NUTT et al., 2015).

Células B de memória são células que já tiveram contato com certos patógenos adquirindo “experiência”, diferenciam-se rapidamente em plasmablastos e expressam anticorpos de classes modificadas altamente específicos, capazes de eliminar infecções mais rapidamente que as células B naive, sendo essa a principal base para o desenvolvimento de vacinas (DE SILVA; KLEIN, 2015; KUROSAKI; KOMETANI; ISE, 2015). As células B de memória formam agregados extrafoliculares ou foliculares nos tecidos linfoides, podendo se diferenciar em plasmablastos ou retornar ao CG após uma nova exposição aos antígenos, resultando em novas respostas de anticorpos secundários diversificados (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

Células B reguladoras (Breg) são células imunossupressoras que promovem tolerância imunológica através da produção de mediadores anti-inflamatórios e citocinas (IL-10, IL-35 e TGF- β), que suprimem imunopatologias impedindo a expansão de células T e outros linfócitos pró-inflamatórios (ROSSER; MAURI, 2015). Diretamente, interações cognatas entre Breg e células T controlam a expansão de células T reguladoras; indiretamente, Breg inibe a diferenciação de células T auxiliares em Th1 e Th17 por suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016; ROSSER; MAURI, 2015). Células B imaturas e maduras assim como plasmablastos tem a capacidade de se diferenciar em Breg produtoras de IL-10, a ativação de receptores TLR e/ou CD40, a presença de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-21) e também o reconhecimento de antígenos específicos pelo receptor BCR parecem ser os estímulos indutores de diferenciação melhor caracterizados (ROSSER; MAURI, 2015). A Figura 1 D ilustra a versatilidade e o raio de ação das células B.

1.1.5. Moléculas de superfície das células B

Até 1980 muito pouco era conhecido sobre a arquitetura molecular da superfície das células B, pensava-se que sua composição consistia apenas de imunoglobulinas (Ig) ligadas à membrana, receptores de componentes do complemento e receptores Fc, ficando todo o resto praticamente inexplorado. Tudo mudou com o advento da tecnologia de anticorpos monoclonais, um clássico exemplo de como o estudo das células B tem contribuído com importantes ferramentas que influenciam diversas áreas da biologia. Passados 25 anos, aproximadamente 10 moléculas de superfície (Tabela 1), específicas das células B, foram identificadas e tiveram sua nomenclatura padronizada como “*clusters of differentiation*” (CD), a qual foi sancionada pela WHO. A maioria dessas moléculas regula a função e o desenvolvimento das células B assim como facilita a comunicação com o ambiente extracelular (LEBIEN; TEDDER, 2008).

Tabela 1 - Moléculas de superfície (CD) preferencialmente expressas por células B

Nome	Nome original	Reatividade	Estrutura
CD19	B4	Pan-B, FDCs?	Superfamília Ig
CD20	B1	B maduras	Família MS4A
CD21	B2, HB-5	B maduras, FDCs	Receptor de complemento
CD22	BL-CAM, Lyb-8	B maduras	Superfamília Ig
CD23	FcεRII	B ativadas, FDCs e outras	Lectina tipo C
CD24	BA-1, HB6	Pan-B, granulócitos, células epiteliais	Proteínas ancoradas por GPI*
CD40	Bp50	B, células epiteliais, FDCs e outras	Receptor de TNF**
CD72	Lyb-2	Pan-B	Lectina tipo C
CD79a,b	Igα,β	B Ig+ (superfície)	Superfamília Ig

*glicosilfosfatidilinositol

** Fator de necrose tumoral

CD79a (Igα) e CD79b (Igβ) são componentes associados ao receptor BCR cujos domínios citoplasmáticos contêm “*motifs*” altamente conservados que são essenciais para a sinalização e ativação das células B. CD19 é expresso por praticamente todas as linhagens de células B e regula a transdução de sinal amplificando a atividade da Src quinase. CD20 é uma molécula específica das células B maduras que funciona como canal de cálcio embutido na membrana. CD21 é um receptor de complemento (C3d), que também é utilizado como receptor pelo vírus Epstein-Bar, interage com CD19 para gerar sinais que informam as células B sobre o estado inflamatório no microambiente. CD22 tem afinidade por ácido siálico regulando a sinalização das células B. CD23 é um receptor de baixa afinidade por IgE, sendo expresso por células B ativadas influenciando a produção desta imunoglobulina. CD24 é uma glicoproteína ancorada por GPI, apesar de ter sido uma das primeiras moléculas identificadas em células B, sua função permanece desconhecida. CD40 serve como um importante fator de sobrevivência para células B do centro germinativo, seu ligante CD154 é expresso por células T. CD72 tem um efeito regulador negativo sobre as células B (LEBIEN; TEDDER, 2008).

1.1.6. As células B como alvo e reservatório de patógenos

Células T e células B exercem funções indispensáveis na proteção contra infecções por patógenos intracelulares. Por sua vez, as células B foram consideradas, por muito tempo, simples unidades produtoras de anticorpos, mas, atualmente, a importância delas, como protagonistas da resposta imune inata e adaptativa, está sendo cada vez mais reconhecida (AMEZCUA VESELY et al., 2012). Considerando a atuação versátil das células B nas infecções, não é surpresa que a manipulação dessas células fornece uma vantagem seletiva para os patógenos durante a resposta imune.

Diversos patógenos como bactérias, vírus e parasitas têm demonstrado possuir a habilidade de manipular as funções das células B e modular a resposta imune; estes patógenos

afetam as células B de modo indireto, atacando células do sistema imune inato alterando o perfil de citocinas expressas, mas também diretamente prejudicando a resposta humoral (AMEZCUA VESELY et al., 2012; NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015). Estes organismos empregam um amplo repertório de artifícios, seja influenciando a diferenciação das células B em plasmócitos de vida curta ou em células B reguladoras, garantindo uma resposta humoral inespecífica e um ambiente imunossupressor, seja usando abordagens mais agressivas como induzir a morte celular das células B, comprometendo a resposta imune como um todo facilitando a persistência no hospedeiro (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015).

A infecção de células B por vírus é associada com a supressão da resposta protetora promovida por essas células, um dos vírus mais conhecidos por infectar célula B é o Epstein-Bar que usa essas células para se disseminar; outro caso interessante é o do poliomavírus JC que infecta células B humanas para atravessar a barreira hemato-encefálica e de espalhar pelo cérebro (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015).

Bactérias Gram-negativas (*Brucella* spp., *Moraxella* spp., *Samonella* spp., *Yersinia* spp., e *Shigella* spp.) assim como as Gram-positivas (*Listeria* spp.) são exemplos de bactérias intracelulares facultativas que podem infectar células B, *Brucella abortus* por exemplo é um tipo que mostra preferência por células B da ZM e também induz a diferenciação em células Breg (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015). Parasitas como *Leishmania major* também afetam as células B promovendo a diferenciação delas em células Breg (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015).

De modo geral os patógenos usam dois tipos de estratégia para desviar a maturação das células B e prejudicar a resposta imune: a indução de plasmócitos de vida curta que secretam anticorpos de baixa afinidade e a indução de células Breg, cujo papel imunossupressor é benéfico à infecção (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015). Ainda, microorganismos patogênicos podem interferir tanto nas vias que promovem a sobrevivência quanto a morte das células B. De modo interessante, patógenos que usam as células B como nicho de sobrevivência, disseminação ou direcionam o processo de maturação dessas células frequentemente aumentam a sobrevivência das células B para facilitar sua persistência no hospedeiro; por outro lado infecções agudas ou recorrentes são frequentemente acompanhadas de morte das células B e resposta imune prejudicada, sugerindo que a reinfeção é facilitada pela deleção da população celular que confere imunidade protetora (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015).

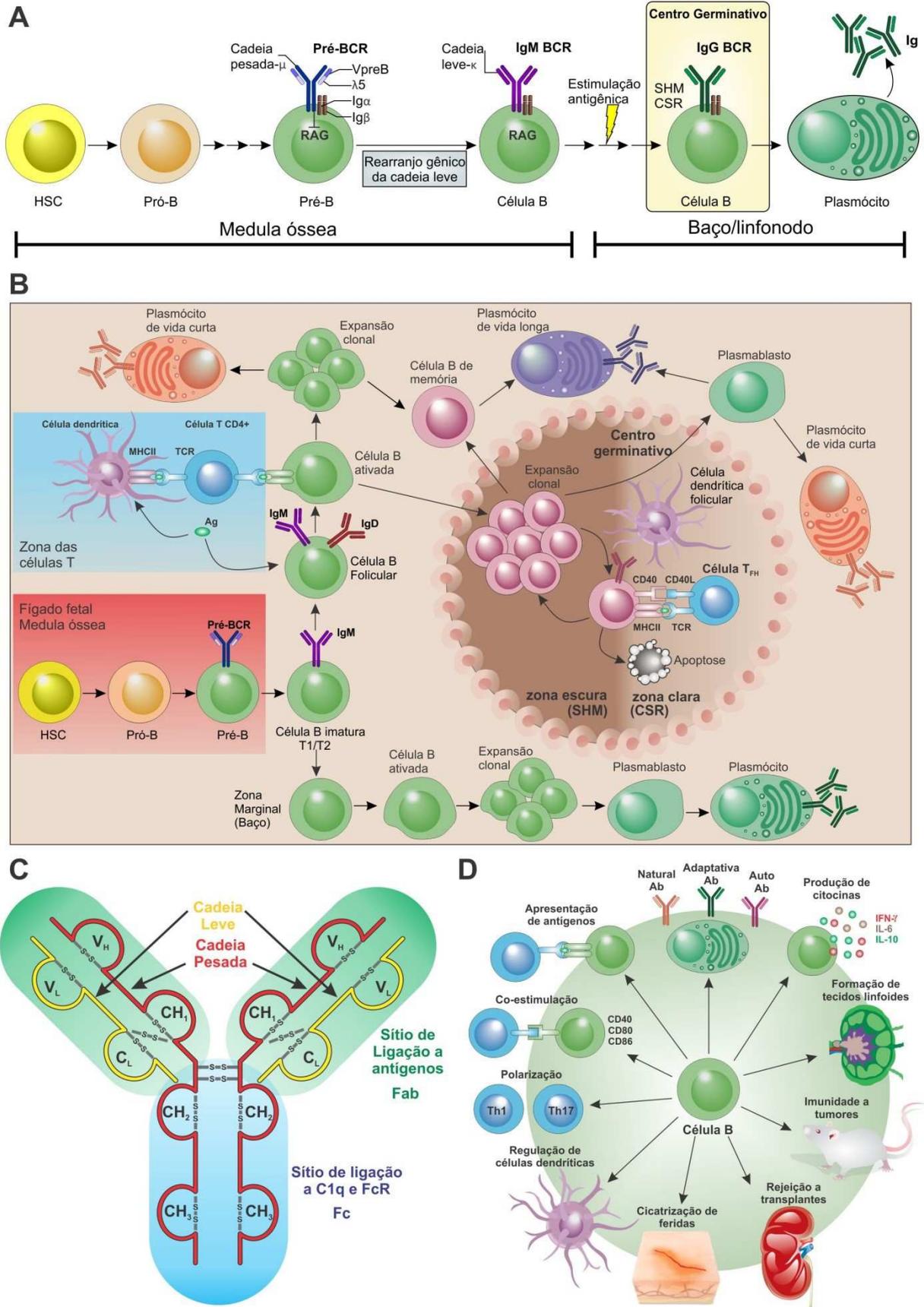


Figura 1. Aspectos gerais sobre o desenvolvimento e funções das células B. (A) composição e expressão do pré-BCR e demais receptores das células B; (B) dinâmica das células B; (C) estrutura dos anticorpos; (D) atributos multifuncionais das células B. Fonte: autores.

1.2. *Trypanosoma cruzi* – Aspectos gerais

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) é um protozoário uniflagelado de notável relevância para a ciência e medicina, principalmente por ser o agente etiológico da doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; SCHMUÑIS, 1991). *T. cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, apresenta um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros invertebrados e vertebrados assim como diferentes formas de desenvolvimento que o parasita assume de acordo com a fase do ciclo (DE SOUZA, 1984; TEIXEIRA et al., 2011).

T. cruzi infecta seus hospedeiros de diversas maneiras: transmissão vetorial, congênita, transfusão de sangue, transplante de órgãos e ingestão oral. A transmissão vetorial envolve triatomíneos hematófagos da família Reduviidae, tais como: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistos* ou *Rhodnius prolixus* (COURA, 2015; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Na transmissão congênita mulheres infectadas transmitem o parasita a seus fetos, que conseqüentemente podem sofrer aborto, parto prematuro, nascer com baixo peso ou desenvolver os sintomas e complicações da infecção (HOWARD et al., 2014). Transfusão sanguínea é a segunda forma de transmissão mais frequente, isso era evidente apenas na América Latina, mas a crescente migração de indivíduos infectados para países não endêmicos fez com que essa forma de transmissão se tornasse um problema global (COURA, 2015).

A alta prevalência da doença de Chagas em pessoas provenientes de regiões endêmicas assim como o elevado risco de transmissão do parasita por meio de transplantes, fez da infecção por *T. cruzi* uma questão de extrema importância para o transplante de órgãos sólidos, doadores e receptores provenientes dessas áreas precisam ser testados, principalmente os pacientes com cardiomiopatia chagásica necessitam ser monitorados quanto à reativação da doença após transplante de coração (KRANSDORF; ZAKOWSKI; KOBASHIGAWA, 2014).

A infecção por via oral ocorre por meio do consumo de bebidas típicas regionais (açai e caldo de cana), preparadas rudimentarmente e sem condições sanitárias, onde o vetor triatomíneo infectado é triturado durante o processo de preparação do suco e ingerido pelos consumidores (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; YOSHIDA, 2008). Ingestão oral constitui o mais importante modo de transmissão em algumas regiões geográficas (YOSHIDA, 2008); no Brasil, entre os anos 1969 e 2008, centenas de casos de infecção por ingestão oral foram descritos no Amazonas, Amapá, Maranhão e Pará, classificando essa região como endêmica (COURA, 2015).

Os diferentes estágios de desenvolvimento assumidos pelo parasita podem ser observados em hospedeiros vertebrados e invertebrados (DE SOUZA, 2002). Os tripomastigotas sanguíneos (Figura 2 A) são flagelados e não se replicam, amastigotas (Figura 2 B) têm morfologia arredondada e replicam-se no meio intracelular; as duas formas são infectivas, sendo identificadas em hospedeiros mamíferos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Epimastigotas (Figura 2 C) são não infectivos, enquanto tripomastigotas metacíclicos são; as duas formas são observadas no hospedeiro invertebrado, possuem flagelos sendo altamente móveis (BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

No vetor triatomíneo infectado (Figura 2 D) as formas epimastigotas replicam na porção média do intestino do inseto, enquanto que na porção mais distal eles se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos devido ao estresse nutricional que são submetidos nesta parte do intestino (NAKAYASU et al., 2009). Estas formas metacíclicas são expelidas com as fezes e urina do triatomíneo, durante seu repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero (Figura 2 E), elas podem ter acesso à corrente sanguínea (Figura 2 F) seja por meio da picada do inseto, pela exposição ocular ou contato com a mucosa oral do hospedeiro, para em seguida infectar células fagocíticas ou não fagocíticas (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). No interior das células os parasitas ficam envolvidos por um vacúolo parasitóforo, do qual escapam e mudam para a forma amastigota que replica livremente no citoplasma por divisão binária, após várias divisões se diferenciam em tripomastigotas que são liberados no meio extracelular, atingem a corrente sanguínea, onde são ingeridos pelo triatomíneo reiniciando o ciclo (Figura 2 F) (BRENER, 1973; DE SOUZA, 2002; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Um subciclo alternativo pode acontecer em mamíferos, quando formas amastigotas originárias da lise prematura das células infectadas ou decorrentes da diferenciação extracelular de tripomastigotas, infectam células fagocíticas e não fagocíticas, onde sobrevivem dando continuidade ao ciclo intracelular (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; LIMA et al., 2010).

T. cruzi é capaz de invadir e replicar no interior de uma grande variedade de células nucleadas, exibindo tropismo por cardiomiócitos e células musculares lisas do hospedeiro vertebrado (WOOLSEY et al., 2003). O processo de infecção por *T. cruzi* pode ser dividido em três estágios: adesão e reconhecimento, sinalização e invasão; diferentes cepas de *T. cruzi*, assim como diferentes formas do parasita (amastigotas, tripomastigotas de cultura de tecido e tripomastigotas metacíclicos) expressam moléculas distintas em sua superfície, as quais interagem com componentes das células hospedeiras durante a invasão; também é importante

destacar a capacidade das moléculas secretadas pelo parasita que exercem um papel fundamental na invasão (DA SILVA et al., 2009; DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010).

1.2.1. Doença de Chagas

A descoberta da tripanossomíase americana por Carlos Chagas (1909) foi uma das mais surpreendentes e bem sucedidas em toda a história da medicina tropical (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). Nomeada como “doença de Chagas”, ela é um dos principais problemas de saúde pública da América Latina assim como uma das doenças tropicais negligenciadas mais prevalentes, tendo um impacto negativo na economia de países em desenvolvimento, taxa de mortalidade considerável (mais de 10.000 mortes por ano) com vinte cinco milhões de pessoas vivendo sob risco de adquirir a doença (<http://www.who.int/chagas/disease/en/>).

A doença manifesta-se em duas fases: aguda e crônica (STANAWAY; ROTH, 2015). A fase aguda ocorre imediatamente após a infecção, pode ser assintomática ou produzir febre, mal estar, adenopatia generalizada, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, parasitemia elevada, miocardite e meningoencefalite em casos mais graves (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). A forma indeterminada é caracterizada por infecção assintomática crônica, 50% dos indivíduos infectados permanecerão nessa forma por toda vida e não sofrerão sequelas (STANAWAY; ROTH, 2015). Porém, alguns indivíduos (20% a 30%), após permanecerem na forma indeterminada por 10 a 20 anos desenvolvem complicações cardíacas e digestivas provenientes da infecção crônica, tais como: cardiomiopatias (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017; CUNHA-NETO; CHEVILLARD, 2014), megacólon e megaesôfago (JABARI et al., 2014). Atualmente não há nenhum tipo de vacina efetiva disponível, o tratamento farmacológico é restrito a duas drogas, nifurtimox e benznidazol, que apresentam eficácia limitada, toxicidade, efeitos colaterais indesejáveis que dificultam a adesão ao tratamento e não funcionam na fase crônica (URBINA; DOCAMPO, 2003); além disso, cepas naturalmente resistentes a essas drogas já foram descritas (MURTA et al., 1998).

A resposta imune ativada durante a infecção por *T. cruzi* parece não ser suficiente para erradicar o parasita, permitindo a cronificação da doença de Chagas (BERMEJO et al., 2011; ZUNIGA et al., 2005). Isso somente é possível porque o parasita evoluiu estratégias fascinantes para evadir do sistema imune (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Entretanto, pouca ou nenhuma atenção tem sido dada ao estudo da infecção direta das

células B por *T. cruzi* e suas consequências. Também, o envolvimento das células B na patogenia da doença de Chagas tem sido ofuscado pelo destaque que as pesquisas dão ao estudo das células T nesse contexto, deixando o papel das células B em segundo plano.

Este estudo contribuirá para esclarecer alguns mecanismos da biologia das células B no contexto da infecção por protozoários, ajudando na busca de estratégias imunológicas que promovam uma resposta celular e humoral mais efetiva contra o parasita. Dessa forma, a identificação de mecanismos capazes de melhorar a resposta humoral das células B também será benéfica para controlar a infecção por outros patógenos. Ainda, o presente estudo contribuirá no entendimento da biologia do parasita, principalmente por esclarecer alguns aspectos relacionados às manobras de evasão do sistema imunológico e distorção da resposta humoral das células B, sendo de grande interesse para pesquisadores que trabalham com patogenia e imunidade durante infecção intracelular por protozoários.

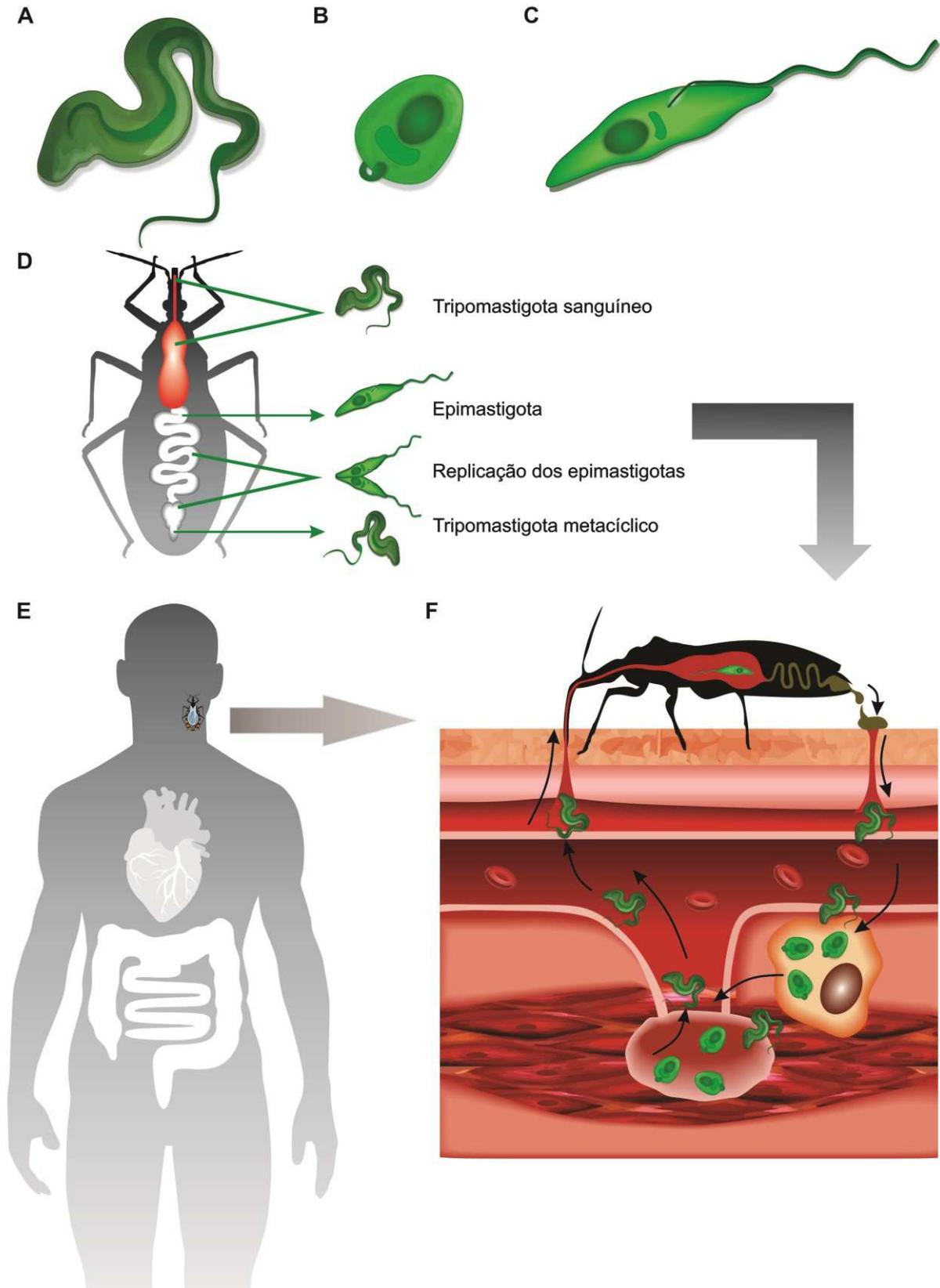


Figura 2. Formas de desenvolvimento e ciclo de vida de *Tripanosoma cruzi* nos hospedeiros invertebrados e vertebrados. (A) *Tripomastigota*, (B) *amastigota* e (C) *epimastigota*. (D) Ciclo de vida de *T. cruzi* no hospedeiro triatomíneo; (E-F) ciclo de vida de *T. cruzi* no hospedeiro humano e complicações da fase crônica da infecção, megacólon e cardiomegalia. Fonte: autores

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar o processo de infecção das células B por *T. cruzi*, visando identificar eventos celulares que contribuam para esclarecer os mecanismos mobilizados pelo parasita na evasão da resposta imune do hospedeiro.

2.2. Objetivos específicos

- Rastrear células B parasitadas em camundongos submetidos à infecção experimental por *T. cruzi*;
- Investigar a infecção das células Namalwa (células B/linfoma de Burkitt) por *T. cruzi* *in vitro* e quantificar a carga parasitária;
- Detectar e descrever as modificações que o parasita provoca no citoesqueleto de actina das células B durante a invasão;
- Investigar os eventos celulares ativados por *T. cruzi* que resultam nessas modificações no citoesqueleto de actina das células B e facilitam a internalização do parasita;
- Investigar as vias de sinalização ativadas por *T. cruzi* na invasão;
- Avaliar e quantificar a viabilidade das células B após a infecção por *T. cruzi*;
- Quantificar a multiplicação intracelular do parasita assim como a multiplicação das células B submetidas à infecção por *T. cruzi*;
- Correlacionar os eventos observados no estudo da infecção das células B por *T. cruzi* com os mecanismos de evasão do sistema imune que favorecem a persistência do parasita no hospedeiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos e legais

Este estudo é uma das ramificações do projeto principal intitulado: Estudos do papel do citoesqueleto de actina, de citocinas e da proteína P21 de *T. cruzi* na evolução para a fase crônica da doença de Chagas experimental. Todos os experimentos foram previamente

aprovados pelo Comitê de Ética para utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), com número do protocolo 105/10 (Anexo1). Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos (Blocos 2B, sala 200) do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ICBIM-UFU).

3.2. Camundongos

Foram utilizados camundongos selvagens (WT) BALB/c de 6-8 semanas de vida, criados e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU, campus Umuarama. Os animais foram mantidos livres de patógenos específicos não pertinentes ao estudo, em condições padronizadas de luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuro), em temperatura controlada (25 ± 2 °C) bem como ração e água *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados através do deslocamento cervical após serem anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Syntec) e Cloridrato de Xilazina (Syntec), conforme as normas do CEUA e prescrições do médico veterinário responsável técnico.

3.3. Anticorpos e reagentes

Neste estudo foram utilizados os seguintes materiais, reagentes, anticorpos e kits:

- Tampão ACK (amônio-cloreto-potássio, $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3$) para lise de células vermelhas, preparado no próprio laboratório;
- Solução de Bouin (HT10132), solução de Giemsa (GS500), Faloidina-TRITC (P1951), anti-IgG de coelho conjugado com FITC (F0382), anti-IgG de coelho conjugado com TRITC (T6778), DAPI (D9542), Citocalasina D (C8273), solução de Iodeto de Propídio (P4864) e solução de Poli-L-Lisina (P8920) foram adquiridos na SIGMA-ALDRICH;
- O corante “*CellTraceTM Far Red DDAO-SE (C34553)*” assim como a sonda de cálcio “*Fura RedTM AM (F3021)*” foram adquiridos na Invitrogen Molecular Probes;
- O anticorpo tandem APC/Cy7 anti-CD19 de camundongo foi adquirido na BD Biosciences;
- O kit de apoptose “*FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I*” foi adquirido na BD PharmingenTM;
- AlamarBlue[®] foi adquirido na BIO-RAD;

- O anticorpo anti-PLC γ 1 (sc 7290) foi adquirido na Santa Cruz;
- Os anticorpos anti-Caspase-3 (#9668), anti-Caspase-7 (#9492) e anti-ERK (#4695) assim como os inibidores farmacológicos de PI3K (LY294002), MEK1/2 (U0126) e mTOR (Rapamicina, #9904) foram adquiridos na Cell Signaling;
- O inibidor farmacológico de AKT (Triciribine, 1707-1) foi adquirido na BioVision;
- O inibidor farmacológico de RAS (Farnesyl thiosalicylic acid, 10010501) foi adquirido na Cayman CHEMICAL;
- O inibidor farmacológico de PKC (BISINDOLYLMALEIMIDE VII, B3681) foi adquirido na SIGMA;
- O inibidor farmacológico de PLC (U73122) foi adquirido na Tocris Bioscience;
- O kit para purificação de RNAm “RiboZol™ Plus RNA Purification Kit” (N643-KIT) foi adquirido na Amresco;
- O kit para conversão de RNAm em cDNA “The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” foi adquirido na AB Applied Biosystems.

3.4. Células e parasitas

Células Namalwa (Banco de células do Rio de Janeiro-BCRJ), uma linhagem celular de linfócitos B de um linfoma de Burkitt, foram mantidas em suspensão, cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado com L-glutamina (2mM), D-glicose (4500 mg/L), bicarbonato de sódio (2000 mg/L), HEPES (2380 mg/L), piruvato de sódio (100 mg/L), penicilina (60 mg/L), gentamicina (40 mg/L), estreptomicina (10 mg/L) e 10% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell/Embriolife). Células Vero (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP), fibroblastos de rim de macaco verde da África, foram utilizadas para manutenção do ciclo de *T. cruzi*, sendo cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado como descrito anteriormente. As células foram mantidas em garrafas de cultura estéreis de 75 cm², acondicionadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂; as culturas foram avaliadas diariamente e o meio substituído sempre que necessário.

Este estudo utilizou uma mistura de formas amastigotas e tripomastigotas de cultura de tecidos (TCT), da cepa G de *T. cruzi* (TcI), em todos os ensaios de invasão. Para a obtenção dos parasitas, células Vero cultivadas em meio DMEM com 2,5% de SFB, foram infectadas com formas tripomastigotas provenientes do sangue, coletado assepticamente, de

camundongos imunossuprimidos (Dexametasona via oral) e infectados para a passagem da cepa. Após a eclosão os parasitas (tripomastigotas de cultura de tecido-TCT e amastigotas) foram recolhidos no sobrenadante das células infectadas, centrifugados (4000 rpm por 10 min) e contados usando câmara de Neubauer. As formas amastigotas surgiam no sobrenadante devido à lise prematura das células infectadas ou devido à diferenciação extracelular dos TCT.

3.5. Ensaio de invasão *in vivo*

Camundongos BALB/c foram divididos em dois grupos, infectado e controle, contendo 10 animais cada um. Para a infecção dos animais foram utilizados formas TCT de *T. cruzi* (cepa G) na quantidade de 10^3 parasitas por animal. Usando uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha 13 x 4,5 (BD) foram inoculados 100 μ L/animal da suspensão de parasitas, diluídos em tampão PBS 1X, via intraperitoneal (IP). Após 15 dias de infecção, os animais do grupo infectado e controle foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% via IP, de acordo com a prescrição do veterinário, foram eutanasiados e tiveram seus baços removidos assepticamente. Para registro visual dos baços utilizou-se uma câmera digital na aquisição da imagem, uma régua graduada em cm e mm foi utilizada na fotografia como referência métrica e escala na mensuração dos baços, objetivando demonstrar o aumento do órgão ao longo da infecção. A imagem adquirida serviu para avaliação morfométrica dos baços de animais infectados e não infectados, sendo processada utilizando o software ImageJ (versão 1.51n) para estimar a área (cm^2) dos órgãos. Depois, os órgãos foram processados para análise por citometria de fluxo.

3.6. Ensaios de invasão *in vitro*

As células Namalwa utilizadas neste estudo não são aderentes, logo os ensaios de invasão *in vitro* foram realizados em suspensão. As células foram semeadas em placas de 6 poços, a suspensão de 1000 μ L contendo 5×10^5 células foi incubada com uma mistura de formas amastigotas e TCT, numa proporção de 10 parasitas por célula, em meio RPMI 1640 a 10% de SFB. Optou-se por usar a mistura de diferentes formas do parasita tendo em vista simular minimamente a infecção celular tal como ocorre *in vivo*, salvo a fase que envolve o vetor invertebrado. Cinéticas de invasão em diferentes tempos (15, 30 minutos, 1, 2, e 3 horas) foram realizadas, depois as células foram lavadas por centrifugação (2500 rpm por 5

minutos) três vezes com PBS, para remover os parasitas não internalizados, e processadas para análises por microscopia de luz, imunofluorescência (RIFI), citometria de fluxo e demais ensaios descritos a seguir.

3.7. Microscopia de luz

Como descrito acima, os ensaios de invasão foram realizados em suspensão. A visualização das células Namalwa por microscopia requer que as lamínulas circulares de vidro sejam tratadas previamente (*coating*) com uma solução própria que causa a adesão das células sobre as lamínulas. Para isso, as lamínulas foram colocadas em placas de 24 poços, expostas a uma solução de Poli-L-lisina 10% por 15 minutos, depois a solução foi removida e as lamínulas permaneceram secando por 1 hora na estufa de secagem de material a 50 °C até a completa evaporação do líquido. O tratamento das lamínulas com a Poli-L-Lisina faz com que elas adquiram carga positiva, o que aumenta a interação eletrostática entre os íons carregados negativamente da membrana celular e a superfície das lamínulas, promovendo adesão celular suficientemente forte, permitindo a realização das etapas posteriores do processamento.

Após o tempo de invasão as células foram lavadas três vezes com PBS 1X sendo centrifugadas (2500 rpm por 5 minutos) em cada lavagem para remover os parasitas não internalizados. Após a última lavagem, o pellet foi ressuspenso com PBS e a suspensão de células foi distribuída em uma placa de 24 poços (500 µL por poço) contendo as lamínulas pré-tratadas. Ao final de 15 minutos de adesão, todo líquido foi removido e a solução Bouin (73,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído e 4,8% de ácido acético) foi adicionada aos poços por 15 minutos para fixação das células. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, coradas com Giemsa por 35 minutos e depois descoradas em soluções contendo concentrações decrescentes de acetona e crescentes de xilol (9:1, 7:3 e 3:7). Após secagem, as lamínulas foram coladas sobre lâminas de microscopia usando Entelan (Merck). Essa técnica de coloração permite a distinção entre parasitos aderidos à superfície das células e parasitos internalizados, os quais são vistos rodeados por um halo claro. Células não infectadas foram utilizadas como controle negativo sendo tratadas da mesma maneira. Imagens de campos aleatórios foram obtidas utilizando o microscópio de captura de imagem Leica DM 500 (objetiva de 100x com óleo de imersão) com câmera digital acoplada.

3.8. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Após o ensaio de invasão e posterior adesão às lamínas, as células Namalwa foram fixadas com solução de formaldeído 4% por 1 hora, bloqueadas com solução contendo PBS, 0,25% gelatina e 0,1% azida (PGN) por 1 hora, em seguida submetidas à RIFI. Para marcação dos parasitas intracelulares utilizou-se o anticorpo primário policlonal anti-*T. cruzi* produzido em coelho (diluição de 1:200, *overnight*) e como secundário o anticorpo monoclonal anti-coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, diluição de 1:200; 1 hora). A F-actina foi marcada com faloidina-isotiocianato-5 conjugada com tetrametilrodamina (TRITC, diluição de 1:500; 30 minutos). Os anticorpos foram diluídos em PGN + 0,1% de saponina para permeabilização das células e todos os ensaios de invasão foram marcados com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, diluído em 1:500; 1 hora) para visualização de núcleos e cinetoplastos. Após o tempo de cada incubação com anticorpos em câmara úmida e escura, as lamínulas foram lavadas 3 vezes em PBS. No final da reação de imunofluorescência indireta, as lamínulas foram montadas em glicerol tamponado com 0,1 M Tris pH 8,6 e 0,1% parafenilendiamina (PPD) e examinadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta. As imagens foram adquiridas usando objetiva de 63X com óleo de imersão. Células não infectadas foram utilizadas como controle negativo sendo tratadas da mesma maneira.

3.9. Citometria de fluxo

Para a detecção de células B parasitadas por *T. cruzi* em animais infectados experimentalmente, os baços foram removidos assepticamente, como descrito anteriormente, e processados para análise por citometria de fluxo. Animais não infectados foram usados como controle negativo. As células do baço foram dissociadas mecanicamente com um pistilo e uma peneira de plástico até o estado de uma simples suspensão celular, a qual foi filtrada e lavada diversas vezes por centrifugação (2500 rpm por 5 minutos) usando o tampão de lise de células vermelhas (tampão ACK, $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3$). Em seguida as células foram fixadas com formaldeído 4%, incubadas *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-*T. cruzi* produzido em coelho (1:200) e anticorpo secundário monoclonal anti-coelho conjugado com FITC (1:200; 1 hora). As células B foram marcadas utilizando o anticorpo anti-CD 19 de camundongo conjugado com APC/Cy7 (1:200) por 1 hora. Os anticorpos foram diluídos em PGN + 0,1% de saponina para permeabilização e bloqueio das células. Células B positivas para a infecção foram detectadas por citometria de fluxo.

Para detecção e quantificação da carga parasitária *in vitro* por RIFI, células Namalwa, infectadas como descrito no ensaio de invasão, foram fixadas com formaldeído 4%, lavadas com PBS e incubadas *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-*T. cruzi* produzido em coelho (1:200) e anticorpo secundário monoclonal anti-coelho conjugado com TRITC (1:200; 1 hora). Em outra abordagem, os parasitas foram pré-tratados com uma sonda rastreadora conhecida como DDAO, 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ a cada 3×10^7 parasitas, por 10 minutos e depois lavados por centrifugação (4500 por 10 minutos) com PBS, em seguida os parasitas marcados foram incubados com as células Namalwa nos períodos de tempo pré-determinados e a carga parasitária foi quantificada por citometria de fluxo. Seja por RIFI ou DDAO a carga parasitária foi representada pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI), apesar das porcentagens de células infectadas terem apresentado resultados estatisticamente similares (dados não mostrados) aos da MFI. Células não infectadas foram usadas como controle negativo.

Para investigar as vias de sinalização ativadas por *T. cruzi* durante a invasão, as células B foram pré-tratadas com os seguintes inibidores farmacológicos:

Tabela 2 - Inibidores das vias de sinalização

Inibidor	Via de Sinalização	Marca	Solução de Estoque	Concentração de uso	Tempo de tratamento
LY 294002	PI3K	Cell Signaling	16.27 mM	50 μM	2 h
B3681	PKC	Cayman	1.1 mM	5 μM	2 h
UO126	MEK1/2	Cell Signaling	6.57 mM	10 μM	2 h
Rapamicina	mTOR	Cell Signaling	10 mg/mL	10 nM	2 h
FTA	Ras	Cayman	7 mM	25 μM	2 h
Triciribine	AKT	Biovision	3.1 mM	5 μM	2 h
U73122	PLC	Tocris	5 mM	2.5 μM	2 h

Fonte: Data sheet dos fabricantes/Calbiochem Inhibitor SourceBook

Ainda, este estudo também avaliou por citometria de fluxo a morte celular e apoptose das células B induzidas pela invasão por *T. cruzi*. No ensaio de morte celular uma cinética de invasão foi conduzida, em que células Namalwa foram expostas a uma mistura de tripomastigotas e amastigotas, na proporção de 10 parasitas por célula, em tempos crescentes (2, 6, 12, 24 e 48 horas). Ao final de cada tempo as células foram lavadas 3 vezes com PBS por centrifugação (2500 rpm por 5 minutos) para remover parasitas extracelulares, incubadas por 30 minutos com solução de iodeto de propídio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em diluído em PBS), lavadas novamente com PBS e fixadas com formaldeído 4% por 1 hora. No ensaio de apoptose células Namalwa foram expostas ao parasita por 2 horas; as proporções de células mortas, em

início de apoptose e também em apoptose tardia foram definidas utilizando o kit “*Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*”, conforme instruções do fabricante.

Todas as amostras, incluindo os devidos controles, foram examinadas por citometria de fluxo usando o aparelho FACSCantoII (Becton, Dickinson and Company – BD, Franklin Lakes, NJ, USA), até 50.000 eventos foram adquiridos por amostra em triplicata. Os resultados foram analisados utilizando-se o software FlowJo X (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) e a MFI foi determinada por amostra.

3.10. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a extração de RNA, foi utilizado o “*RiboZol™ Plus RNA Purification Kit*” (Amresco), de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações assim como a qualidade do RNA extraído foram determinadas a 260/280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) e somente as amostras com pureza ideal (2.0 ± 0.1) foram selecionadas.

Para síntese de DNA complementar foi utilizado o “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizou-se 5 µg de RNA em um volume de 13 µL e a reação foi realizada em um termociclador (Techne® Endurance TC-312, UK). O protocolo iniciou-se em uma temperatura de 50 °C, mantida durante 10 minutos e seguido por 37 °C durante 120 minutos. Em seguida, as amostras foram aquecidas até 85 °C durante 5 minutos e, finalmente resfriadas a 4 °C. O cDNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

3.11. Desenho, validação dos iniciadores e quantificação dos níveis transcricionais relativos da Cofilina por qPCR

Os iniciadores específicos para o estudo da expressão relativa da Cofilina foram desenhados, validados e tiveram sua especificidade confirmada utilizando as seguintes ferramentas: IDT PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>), Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), Standard Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

A quantificação gênica relativa foi determinada na plataforma ABI 7300 (Applied Biosystems) e os dados recebidos foram processados usando o Software v1.4.1 SDS (Applied

Biosystems). Cada reação continha 6,25 µL de SYBR® *Green PCR Master Mix (2X)* (Applied Biosystems), 0,4 µM de cada iniciador, e 50 ng de cDNA (volume total da reação de 13 µL). Foram usadas condições de ciclização padrão, tal como recomendado pelo fabricante: 95 °C durante 10 minutos, (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minuto) x 40 ciclos, e a análise da temperatura de melting a 95 °C durante 15 segundos, em seguida 60 °C durante 1 minuto. Cada reação de PCR foi realizada em triplicada, e controles sem cDNA foram incluídos. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Além disso, a análise da temperatura de melting foi realizada em cada ensaio, a fim de detectar as amplificações inespecíficas.

Os níveis relativos de expressão gênica foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ grupo infectado/tratado (alvo do gene Ct – endógeno do gene Ct) - ΔCt grupo não infectado/tratado (gene alvo Ct - Ct do gene endógeno). Beta-2 microglobulina foi utilizado como gene de referência (endógeno). Os valores extremos não foram incluídos na análise estatística.

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a análise dos níveis transcricionais relativos por PCR em tempo real

Genes	Sequências (5'– 3')	PB*	RefSeq**
Homo sapiens Cofilina	Fw – ATGCTGCCAACTTCTAACC Rv – GGGTCATCTCCACAACATTC	84	NM_005507.2
Beta-2 Microglobulina	Fw – CGAAGGTTTCAGTTTTACTCACG Rv – ATTTCAATCTCAGGCGGA	97	NM_001082502

*Tamanho do fragmento em pares de base

**Sequência de referência

3.12. Quantificação de $[Ca^{2+}]$ citosólico em células B

Após os devidos estímulos as células B foram cultivadas em placas de 6 poços em Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS) e incubadas a 37 °C, com Fura Red™ AM 4 uL (400 mg/mL), durante 60 minutos. Após este período de incubação, o Fura Red não internalizado pelas células foi removido por centrifugação (2500 rpm por 5 minutos), lavando as células 3 vezes com HBSS. Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 uL de HBSS e distribuídas numa placa de 96 poços. As determinações de $[Ca^{2+}]$ foram feitas pelo “Glomax® Multimode Readers Promega” nos comprimentos de 405 nM de excitação e 460 nM de emissão.

3.13. Ensaio de ativação de Rac e RhoA GTPases (G-LISA™)

A medida dos níveis de ativação de Rac e RhoA GTPases em células B foi realizada utilizando-se os kits “G-LISA™ Rac Activation Assay Biochem Kit™ Absorbance Based” (BK125, Cytoskeleton Inc.) e “G-LISA™ RhoA Activation Assay Biochem Kit™ Luminescence Based” (BK121, Cytoskeleton Inc.), respectivamente. Os ensaios foram realizados seguindo-se as instruções do fabricante, disponíveis em cada kit. As mensurações foram feitas pelo aparelho Glomax® Multimode Readers (Promega).

3.14. Ensaio de multiplicação de parasitas e células B

As células B foram semeadas em placas de 6 poços (5×10^5 /poço), cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB e mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram expostas ao *T. cruzi* (10 parasitas por célula) por 2 horas, lavadas por centrifugação 3 vezes com PBS para remover parasitas extracelulares e distribuídas numa placa de 24 poços nas condições descritas anteriormente. As células B assim como os parasitas que surgiam no sobrenadante foram contadas, usando câmara de Neubauer, em diferentes tempos após a infecção (2, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas). Células não infectadas foram usadas como controle negativo.

3.15. Western blotting

Células Namalwa foram lisadas com tampão para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) gelado, suplementado com 200 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), coquetel de inibidor de protease e 100 mM de ortovanadato de sódio; dessa solução usa-se 1 mL a cada 2×10^7 células. Após a lise celular, a concentração de proteínas totais dos extratos foi determinada com o espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific™).

As proteínas foram inicialmente separadas em SDS-PAGE 10% e a seguir foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare Life Sciences). Para isso, a quantidade de 25 µg de proteína total dos extratos de cada amostra foi aquecida e desnaturada em tampão de amostra (glicerol 30%, SDS 10%, 15% de β-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol e 150 mM de Tris-HCl pH 6,8) a 95 °C por 5 minutos; depois as amostras foram aplicadas nos poços do gel em duplicata, um poço foi destinado para o padrão de peso molecular (BIO-RAD). As amostras foram aplicadas em gel de empacotamento (0.5

M de Tris-HCl pH 6.8, 30% de acrilamida, 0.4% de SDS, 10% de persulfato de amônia e TEMED), separadas em gel de poliacrilamida a 10% (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% de SDS, 30% de acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED) e a eletroforese foi efetuada na presença de tampão de corrida (glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM, 0,1% de SDS 0,1% e pH 8,3) a 100 V durante 3 horas.

Depois de efetuada a eletroforese, foi realizada a etapa de eletrotransferência úmida das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose. A transferência foi efetuada por 1 hora, com voltagem de 100 V, corrente de 400 mA na temperatura de 4 °C. A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3 %. Em seguida, a membrana foi lavada com PBS tween 0.1% para remover o Ponceau, colocada por 1 hora sob agitação em solução bloqueadora, 5% de leite em pó desnatado em TBST (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,4), para o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST por 8 minutos em agitação e incubada *overnight* sob agitação em câmara fria (4 °C) com o anticorpo primário diluído em TBST contendo 5% de leite em pó desnatado. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-PLC γ 1 (Santa Cruz), anti-Caspase-3 (Cell Signaling), anti-Caspase-7 (Cell Signaling) e anti-Erk (Cell Signaling). Depois do tempo de incubação com os anticorpos primários, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST com 5% de leite em pó desnatado por 5 minutos (por três vezes), e incubada 1 hora com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) diluído em TBST com 5% de leite em pó desnatado. Após o tempo de incubação a membrana foi novamente lavada 3 vezes com em TBST contendo 5% de leite em pó desnatado por 8 minutos e o anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) foi então aplicado por 1 hora e depois lavado em TBST 3 vezes por 8 minutos. As bandas proteicas foram detectadas por meio da reação de eletroquimioluminescência (ECL) utilizando-se o kit “*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate*” (Thermo Fisher Scientific), a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ (versão 1.51n) apresentada em unidades arbitrárias.

3.16. Análise estatística

Todos os experimentos foram repetidos até 3 vezes sendo conduzidos em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. A comparação de dados entre os grupos foi analisada pelo teste T não pareado de

Student, two-way ou one-way ANOVA; o teste de Tukey (paramétrico) ou o teste de Dunn (não paramétrico) foram utilizados para análise de comparação múltipla entre os grupos, de acordo com o desenho experimental. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *T. cruzi* infecta células B *in vivo* e *in vitro*

Para avaliar se *T. cruzi* infecta células B *in vivo*, camundongos BALB/c foram inoculados com o parasita por via intraperitoneal, um grupo de animais não infectados serviu de controle negativo da infecção. Após 15 dias os animais foram anestesiados, conforme prescrição veterinária, eutanasiados e tiveram o baço removido assepticamente para análise morfométrica e por citometria de fluxo. Como esperado, a análise morfométrica indicou que a área dos órgãos no grupo infectado era o dobro em relação ao grupo não infectado (Figura 3 A), confirmando a infecção. Para investigar a possibilidade da infecção das células B acontecer *in vivo*, o baço dos animais foi processado para análise por citometria de fluxo, o parasita foi marcado com anticorpo primário anti-*T. cruzi* produzido em coelho e anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC, as células B foram marcadas com anticorpo anti-CD19 de camundongo conjugado com APC-Cy7 (Figuras 3 B-G), assim as células B que demonstrassem dupla marcação estariam infectadas. A Figura 3 G mostra uma porcentagem de 14,4% de células B infectadas por *T. cruzi* (Quadrante Q2), que também apresentaram a MFI significativamente maior que o grupo não infectado (Figura 3 H). Esses resultados sugerem que na infecção experimental de camundongos por *T. cruzi* as células B também sofrem invasão pelo parasita.

Ensaio de invasão de células Namalwa por *T. cruzi* foram realizados para determinar, quantificar e visualizar a infecção das células B *in vitro*. A invasão ocorreu em suspensão durante tempos crescentes de exposição das células aos parasitas (15 e 30 minutos, 1, 2 e 3 horas de infecção). Duas técnicas de marcação foram utilizadas para a quantificação intracelular do parasita: na primeira *T. cruzi* foi marcado por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com TRITC, na segunda o parasita foi marcado com a sonda DDAO; a carga parasitária foi quantificada por citometria de fluxo. As duas técnicas de marcação mostraram resultados similares, especialmente no tempo de invasão de 2 horas que apresentou resultados significantes em ambos os ensaios (Figura 4 A-L). Para os ensaios seguintes padronizou-se o

uso da sonda DDAO nas marcações do parasita assim como o tempo de invasão de duas horas.

Para visualizar a infecção das células B por *T. cruzi* utilizando microscopia de luz e microscopia confocal, outros ensaios de invasão foram conduzidos e as células foram processadas para coloração de Giemsa ou RIFI. Imagens obtidas com microscopia de luz mostraram tripomastigotas e amastigotas no interior das células, a coloração de Giemsa permitiu distinguir parasitas aderidos à superfície das células daqueles internalizados, que apresentaram um halo claro ao seu redor (Figura 5 A e B). Imagens semelhantes foram obtidas por microscopia confocal de parasitas marcados por RIFI (Figura 5 C e D). Todos esses resultados indicam que *T. cruzi* pode infectar células B *in vivo* e *in vitro*.

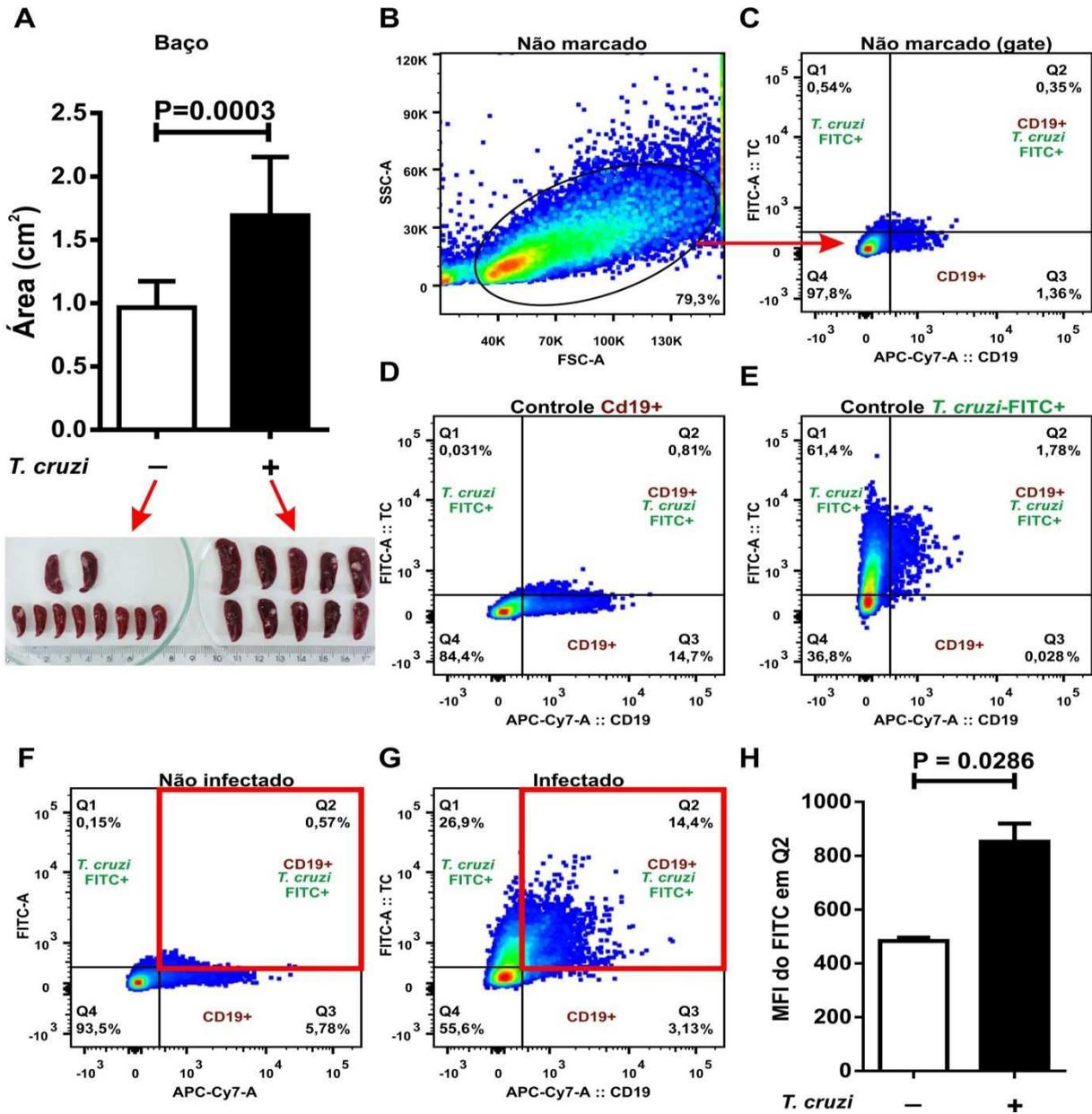


Figura 3. Detecção de células B infectadas por *T. cruzi* em modelo animal de doença de Chagas aguda. Camundongos BALB/c foram infectados com tripomastigotas e analisados após 15 dias de infecção. (A) Os baços foram colhidos (n = 10 animais por grupo) e medidos; baços de animais infectados apresentaram uma área maior em relação ao grupo não infectado, as imagens foram obtidas com uma câmera digital e a área dos órgãos foi medida usando o software ImageJ (versão 1.51n). (B-G) Foram analisados por citometria de fluxo um total de 50 mil eventos da suspensão de células de cada amostra, grupo infectado e controle negativo. (B e C) Controles não marcados foram usados na definição da estratégia de gate mais adequada às análises. As amostras (grupo infectado e controle negativo) foram marcadas com anticorpo primário anti-*T. cruzi* produzido em coelho e anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC (verde), as células B foram marcadas com anticorpo anti-CD19 de camundongo conjugado com APC/Cy7. (D) controle positivo para células CD19+, (E) controle positivo de células infectadas, *T. cruzi*-FITC+. (F) Animais do grupo controle negativo não apresentaram porcentagens significativas de células CD19+*T. cruzi*-FITC+ (duplo positivo) em relação ao (G) grupo infectado, que tiveram valores maiores de MFI (H). Os dados em B-H foram obtidos a partir de suspensões de células provenientes dos baços de animais infectados ou não, 10 animais por grupo, sendo representativos de dois experimentos independentes. Os dados em A-H correspondem à média das triplicatas \pm DP, foram analisados com teste t de Student (Mann-Whitney two tailed test). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. As barras de erro representam o desvio padrão. Os valores de p estão indicados nas figuras. MFI = intensidade mediana de fluorescência.

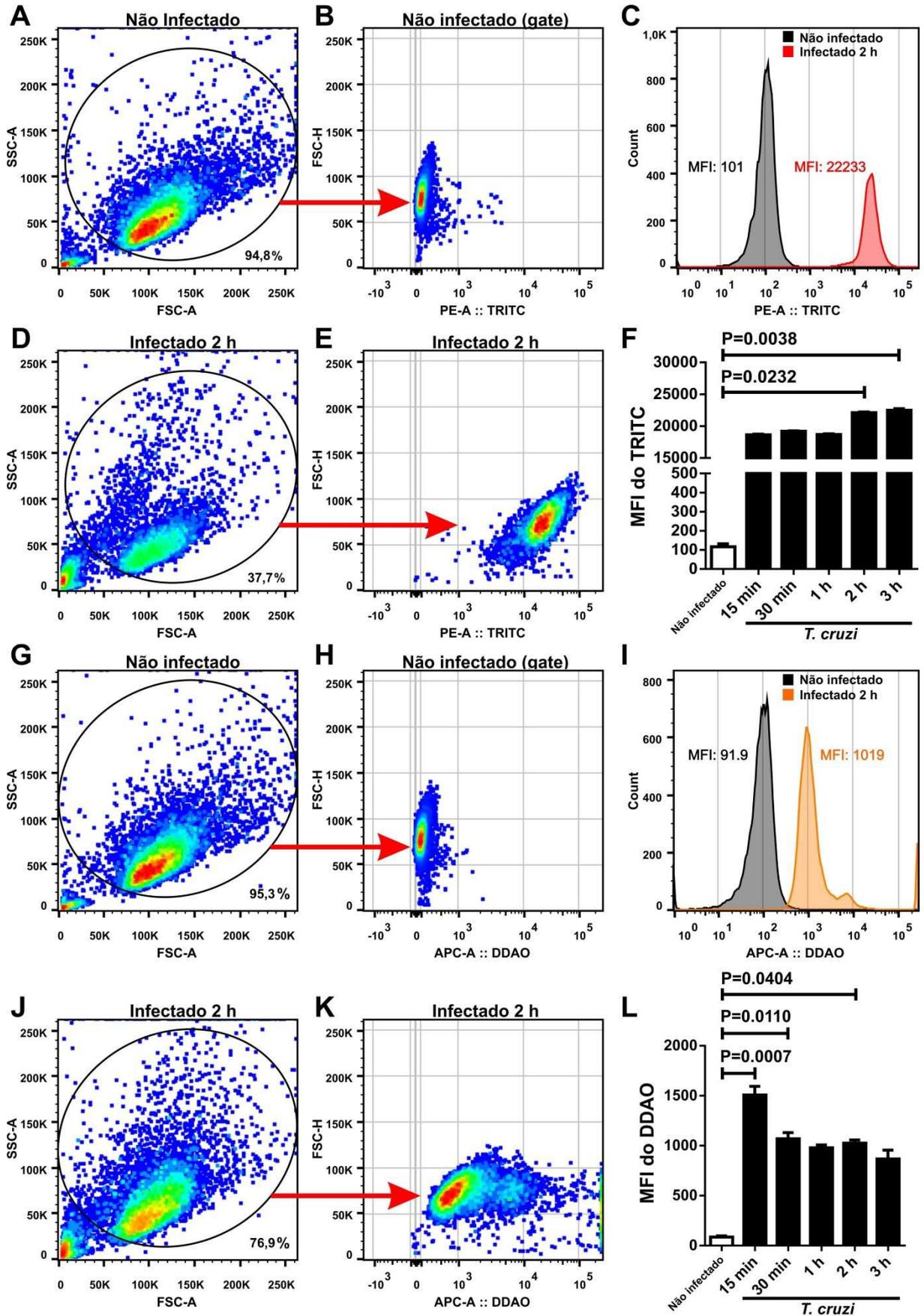


Figura 4. *T. cruzi* infecta células B humanas *in vitro*. Células Namalwa foram incubadas com uma mistura de tripomastigotas e amastigotas (10 parasitas por célula) durante 2 h, fixadas e coradas para quantificação da carga parasitária por citometria de fluxo. (A-L) Análise do perfil da população celular (20.000 eventos), definição da

estratégia de gate e quantificação da invasão parasitária por MFI. (A e B) Células não infectadas e (D e E) infectadas foram marcadas com anticorpo primário anti-*T. cruzi* produzido em coelho e anticorpo secundário anti-coelho conjugado com TRITC. (C) Análise do histograma assim como (F) quantificação da MFI mostram que *T. cruzi* também é capaz de infectar células B humanas *in vitro*. Em outro ensaio de invasão, *T. cruzi* foi pré-corado 15 minutos com a sonda DDAO e incubado com células Namalwa como descrito acima; (G e H) células não infectadas, (J e K) células infectadas por *T. cruzi* marcado com DDAO. Quantificações realizadas no ensaio de invasão das células B por parasitas marcados com DDAO (I e L) mostraram resultados semelhantes aos obtidos com o parasita marcado com TRITC. Os dados em F e L correspondem à média das triplicatas \pm DP e foram analisados pelo método one-way ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Os dados são provenientes de até três experimentos independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. Os valores p estão indicados nas figuras. MFI = intensidade mediana de fluorescência.

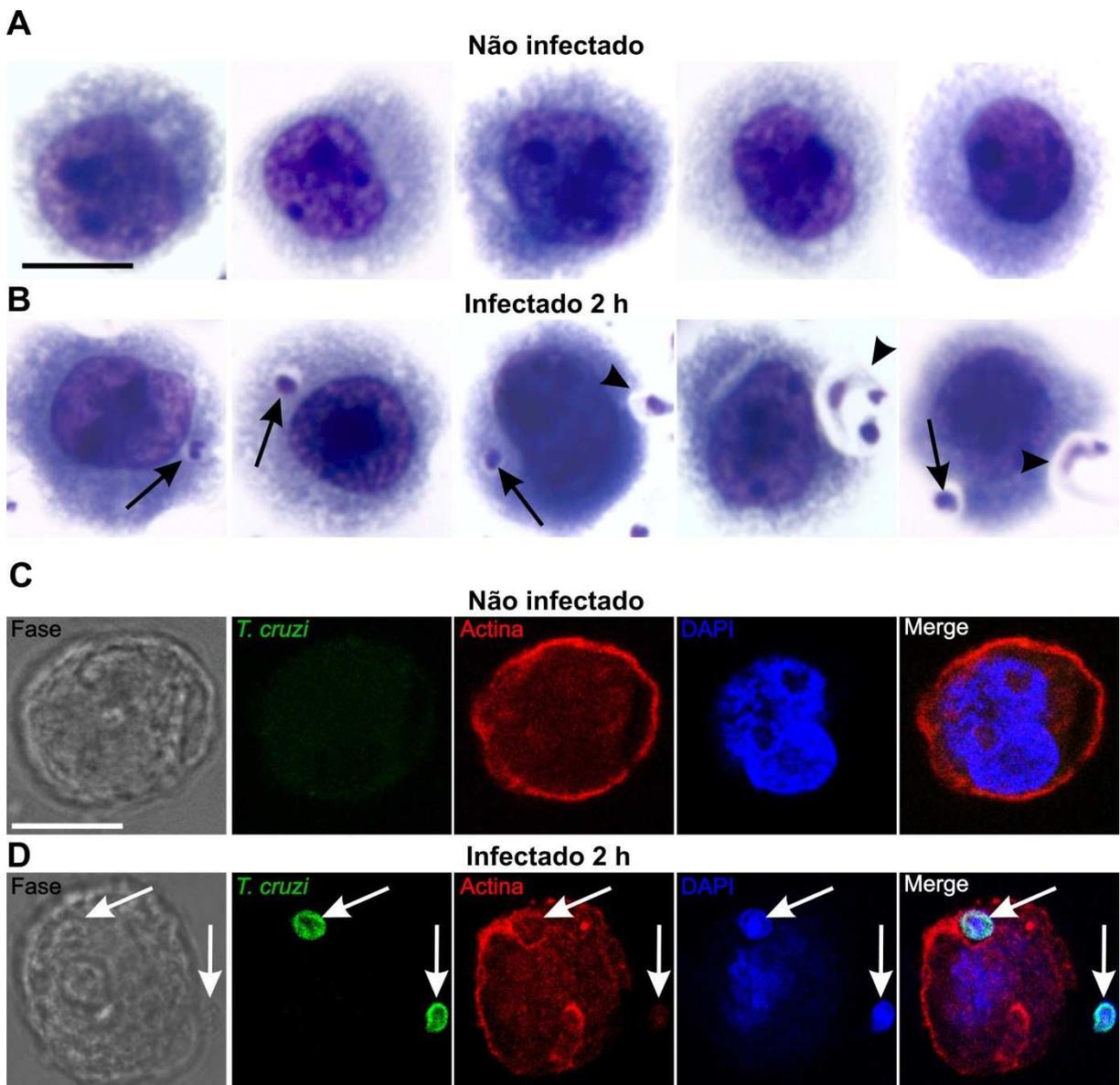


Figura 5. *T. cruzi* pode ser visualizado no interior das células B por microscopia de luz e microscopia confocal. (A e B) Imagens de microscopia de luz de células Namalwa não infectadas e infectadas por tripomastigotas e amastigotas (2 horas, 10 parasitas por célula), fixadas e coradas com Giemsa para visualização dos parasitas internalizados. Barras, 10 μ M. As imagens foram adquiridas com o microscópio Leica DM 500 usando a objetiva de 100x 1.3 N.A com óleo de imersão. (C e D) Imagens de RIFI de células Namalwa não infectadas e infectadas como descrito acima, fixadas com PFA, permeabilizado, o citoesqueleto de actina foi

corado com Faloidina-TRITC (Vermelho), os núcleos foram corados com DAPI (azul) e o parasita marcado com anticorpo primário anti-*T. cruzi* produzido em coelho e anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC (verde). Barras, 10 μ M. As imagens foram obtidas com o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta usando a objetiva 63x 1.4 N.A com óleo de imersão. As setas indicam amastigotas intracelulares, os quais são vistos rodeados por um halo claro ao seu redor. Cabeças de setas indicam tripomastigotas.

4.2. U73122, um inibidor de Fosfolipase C, aumenta a infecção das células B por *T. cruzi* por despolimerizar o citoesqueleto de actina

Para explorar os mecanismos utilizados por *T. cruzi* para invadir células B, primeiramente investigou-se as vias de sinalização ativadas pelo parasita durante o processo de infecção das células. Para este propósito, as células B foram tratadas previamente com diferentes drogas inibidoras das principais vias de sinalização (PI3K, AKT, MEK1/2, RAS, mTOR e PKC) para testar a viabilidade e realizar os ensaios de invasão. Os resultados de viabilidade celular obtidos utilizando resazurina (Alamar blue) demonstraram que somente o inibidor das via de RAS induziu citotoxicidade (Figura 6 A) e nenhum dos inibidores apresentou algum impacto significativo na taxa de invasão, avaliada por citometria de fluxo (Figura 6 B).

A elevação do cálcio intracelular ativada por *T. cruzi* é importante para o sucesso na invasão celular (BURLEIGH; ANDREWS, 1998) e requer a ativação de mecanismos que induzem o aumento da concentração do cálcio citosólico no parasita e na célula hospedeira (NEIRA; FERREIRA; YOSHIDA, 2002). Devido à via da PLC γ ser uma das principais reguladoras da mobilização do cálcio intracelular via ativação do receptor BCR em células B (MAUS et al., 2013), testou-se o efeito do inibidor farmacológico da PLC U73122 na viabilidade assim como na infecção dessas células por *T. cruzi*. Foi observado que o tratamento das células B com U73122 não induziu citotoxicidade na concentração de 2,5 μ M (Figura 6 C); alguns autores trabalhando com linfomas e células B do baço de camundongos relataram que nessa concentração U73122 é capaz de abolir completamente a mobilização do cálcio que ocorre após ativação do receptor BCR (MAUS et al., 2013). No que diz respeito à infecção, o pré-tratamento com 2,5 μ M de U73122 induziu aumento na invasão por *T. cruzi* (Figura 6 D).

Para investigar os efeitos de U73122 sobre citoesqueleto de actina, células B foram pré-tratadas com essa droga, tiveram seu citoesqueleto de actina marcado com Faloidina conjugada a TRITC, a seguir as células foram analisadas por microscopia confocal e citometria de fluxo. Ambos os ensaios mostraram que U73122 reduzia a polimerização do citoesqueleto de actina de modo similar ao tratamento com Citocalasina D, que é um

reconhecido inibidor da polimerização da actina (Figura 6 F-K). Ainda, foi demonstrado que a expressão do RNAm da Cofilina, uma proteína cujo efeito é cortar filamentos de actina, estava aumentando após o pré-tratamento das células B com U73122 em relação às células não tratadas (Figura 6 E, Figura 7 A e B). Em conjunto, os resultados sugerem que U73122 aumenta a suscetibilidade das células B à invasão por *T. cruzi* por despolimerizar o citoesqueleto de actina.

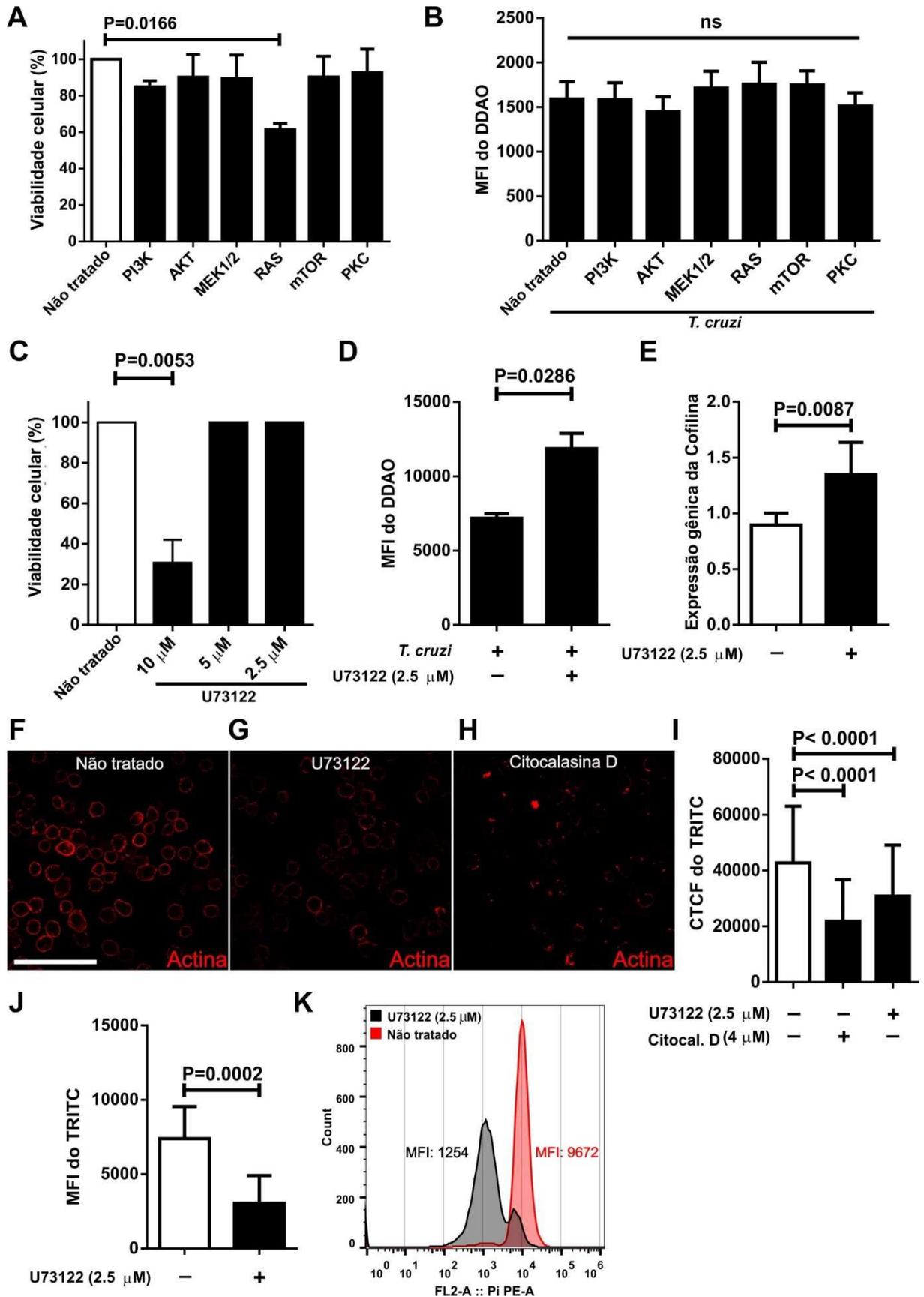


Figura 6. U73122 potencializa a invasão das células B por *T. cruzi* despolimerizando a actina cortical. (A) Células Namalwa foram tratadas por 2 horas com inibidores farmacológicos das principais vias de sinalização indicados e a viabilidade celular foi avaliada. (B) Células Namalwa foram pré-tratadas os com inibidores

indicados, lavadas com PBS e a seguir incubadas com uma mistura de tripomastigotas e amastigotas (2 h, 10 parasitas por célula) pré-marcados com DDAO, as taxas de infecção foram avaliadas por citometria de fluxo. (C) Células Namalwa foram tratadas com o inibidor farmacológico de PLC (U73122) por 2 horas nas concentrações indicadas e a viabilidade celular foi avaliada. (D) Células Namalwa foram pré-tratadas ou não com U73122 por 2 horas, lavados com PBS e incubadas com *T. cruzi* como descrito acima. (E) A expressão do RNAm da Cofilina por células Namalwa tratadas ou não com U73122 por 2 horas, avaliada por qPCR. (F-H) Células Namalwa foram tratadas ou não com U73122 e Citocalasina D por 2 horas, fixadas com PFA, permeabilizadas e o citoesqueleto de actina foi corado com Faloidina-TRITC (vermelho); As imagens foram obtidas com um microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta, com a objetiva 40x, 5 campos para cada condição; (I) quantificação da CTCF usando o software ImageJ (versão 1.51n). Barras, 20 μ M. (J e K) células Namalwa foram tratadas ou não com U73122 por 2 horas, fixadas com PFA, o citoesqueleto de actina foi marcado com Faloidina-TRITC e analisado por citometria de fluxo. Controles não tratados e/ou não infectados foram devidamente incluídos. Os dados correspondem às médias das triplicatas \pm DP, analisados pelo método one-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Dunn) ou teste t de Student (Mann-Whitney two-tailed test). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. ns = não significativo. Os dados são provenientes de até três experimentos independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. Os valores p estão indicados nas figuras. MFI = intensidade mediana de fluorescência. CTCF = Fluorescência celular total corrigida.

A



B

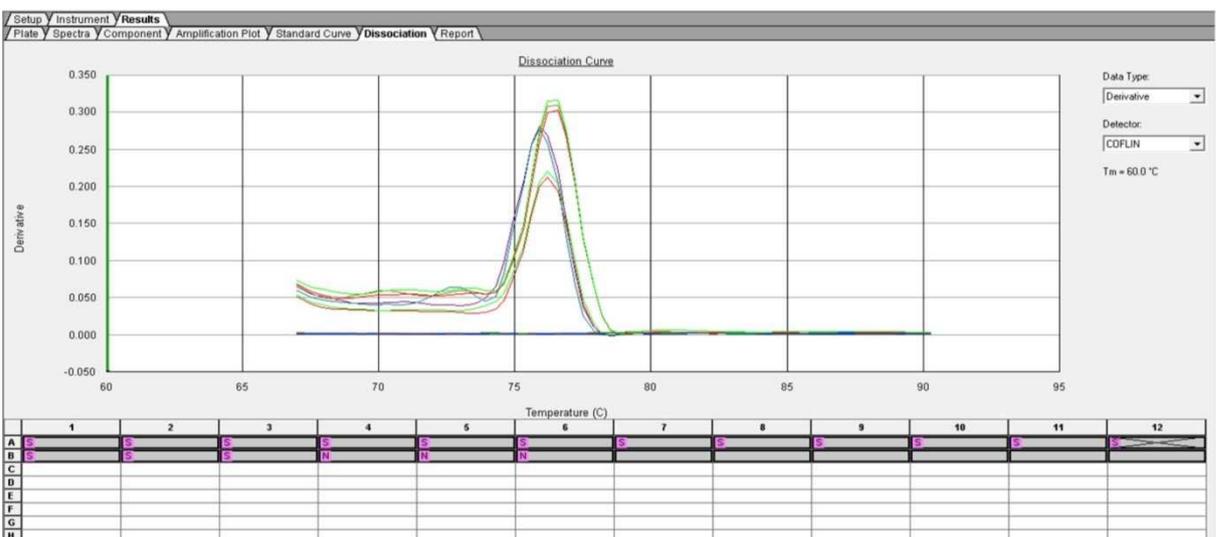


Figura 7. qPCR da expressão gênica relativa do RNAm da proteína Cofilina. (A) Curvas de amplificação. (B) Curvas de dissociação.

4.3. Infecção por *T. cruzi* induz polimerização da actina no sítio de invasão e despolimerização geral do citoesqueleto de actina

Para estudar o papel do citoesqueleto de actina na infecção das células B por *T. cruzi*, ensaios de invasão foram conduzidos focados nos efeitos da invasão sobre o citoesqueleto de actina. Imagens obtidas por microscopia confocal mostram que células não infectadas possuem actina cortical com integridade intacta, por outro lado células infectadas exibem prolongamentos ricos em actina no sítio de invasão ao redor do parasita, acompanhada de uma despolimerização total do citoesqueleto de actina dessas células (Figura 8 A). Para determinar diretamente se *T. cruzi* induz despolimerização do citoesqueleto de actina das células B, ensaios de invasão foram conduzidos e análises do citoesqueleto, marcado com Faloidina-TRITC, foram realizadas por citometria de fluxo; células infectadas apresentaram níveis baixos de MFI em relação às células não infectadas (Figura 8 B). Para estabelecer uma relação causal direta entre despolimerização do citoesqueleto de actina e aumentos na taxa de infecção, ensaios de invasão foram conduzidos, onde as células B foram pré-tratadas com U73122 e/ou Citocalasina D, a seguir infectadas por *T. cruzi* e a carga parasitária foi quantificada por citometria de fluxo; os resultados mostram que as células tratadas com U73122 e Citocalasina D apresentaram maiores taxas de invasão do que as células não tratadas (Figura 8 C). No geral, esses resultados sugerem que o parasita afeta o citoesqueleto de actina das células B no processo de invasão e o tratamento com drogas que atuam na despolimerização do citoesqueleto aumenta a invasão por *T. cruzi*.

Para explorar os mecanismos ativados pelo parasita que causam despolimerização da actina nas células B, primeiramente avaliou-se os efeitos da infecção na concentração de cálcio intracelular das células B após o tempo de invasão. Para esse fim, utilizou-se uma sonda indicadora dos níveis de cálcio (Fura Red). O parasita induziu um significativo aumento da concentração citosólica de cálcio em relação às células não infectadas, mesmo após um tempo tão longo quanto 2 horas de invasão; resultados similares foram obtidos tratando as células com U73122 antes da infecção, mostrando que apesar da via PLC estar inibida o parasita ainda sim foi capaz de estimular o aumento do cálcio intracelular nas células B (Figura 9 A). Outros fatores avaliados foram os níveis de ativação das GTPases Rac e RhoA nas células B após a infecção por *T. cruzi*. Ensaios de G-LISA mostram que a invasão por *T. cruzi* reduziu a ativação da Rac GTPase (Figura 9 B) e não afetou a RhoA GTPase (Figura 9 C) em relação às células não infectadas; nenhuma diferença significativa foi detectada em células tratadas com U73122. Finalmente, avaliou-se a expressão do RNAm da

Cofilina em células infectadas por *T. cruzi*, pré-tratadas ou não com U73122, como resultado o tratamento com a droga também aumentou a expressão da Cofilina nas células infectadas em relação às não-tratadas e infectadas (Figura 9 D). Coletivamente, esses resultados sugerem que o parasita induz despolimerização do citoesqueleto de actina das células B por aumentar a concentração citosólica do cálcio e reduzir a ativação da Rac GTPase, também o tratamento com U73122 parece ajudar a induzir essa despolimerização por aumentar a expressão do RNAm da Cofilina.

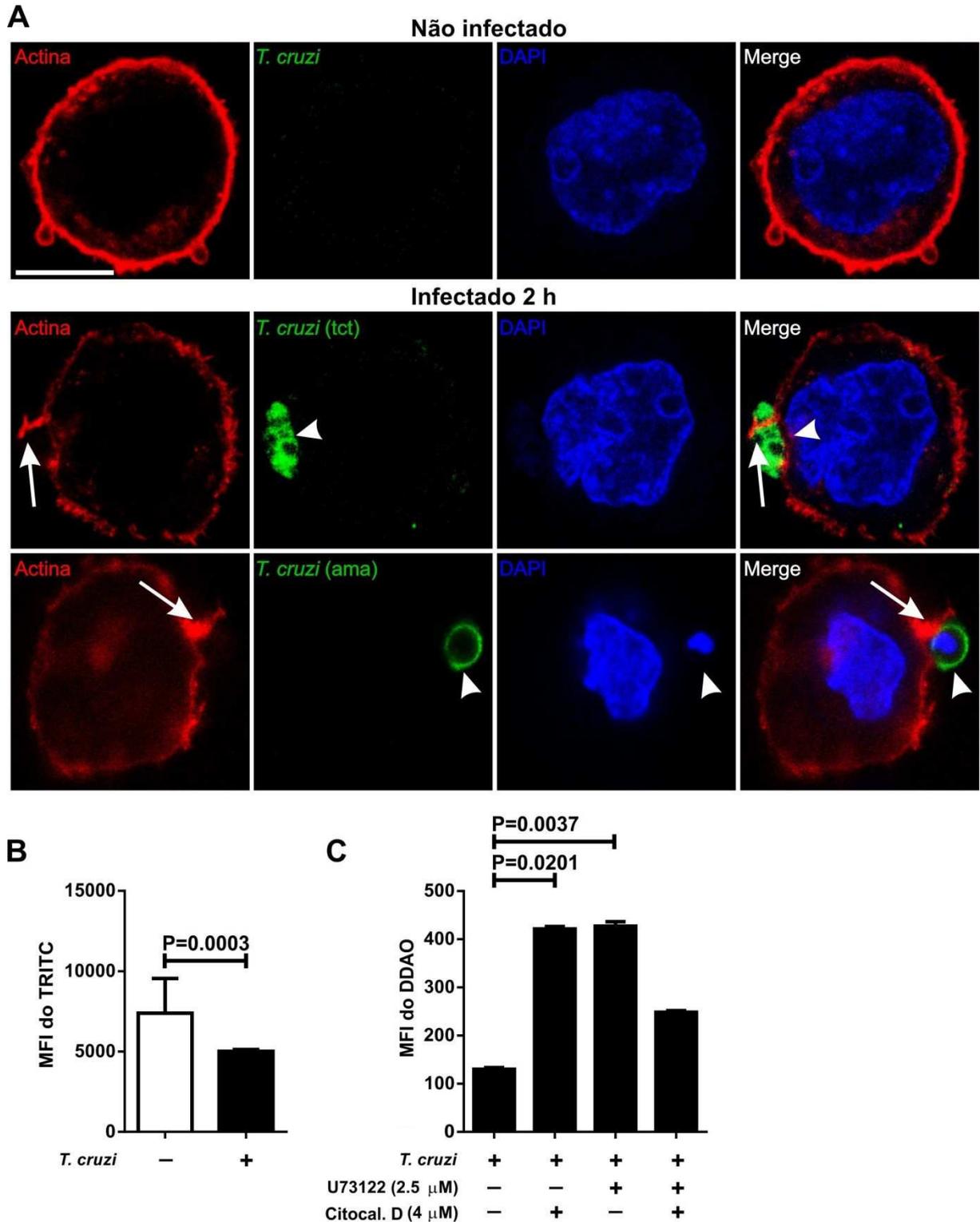


Figura 8. *T. cruzi* afeta o citoesqueleto de actina cortical das células B durante a infecção. (A) Células Namalwa foram incubadas com uma mistura de tripomastigotas e amastigotas (2 h, 10 parasitas por célula), lavadas, fixadas com PFA, permeabilizadas, o citoesqueleto de actina foi corado com Faloidina-TRITC (Vermelho), os núcleos foram corados com DAPI (azul); o parasita foi marcado com anticorpo primário anti-*T. cruzi* produzido em coelho e anticorpo secundário anti-coelho conjugado com FITC (verde). Barras, 10 μ M. As imagens foram adquiridas com o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta, objetiva de óleo 63x 1.4 N.A com óleo de imersão. As setas indicam prolongamentos ricos em actina da membrana celular ao redor dos parasitas. Cabeças de setas indicam os parasitas. (B) O citoesqueleto de actina das células Namalwa infectadas ou não por *T. cruzi* foi corado com Faloidina-TRITC e analisado por citometria de fluxo. (C) As células foram pré-tratadas

com U73122 e/ou Citocalasina D durante 2 horas nas concentrações indicadas, a seguir foram incubadas com *T. cruzi* (2 horas, 10 parasitas por célula) pré-corados com DDAO e as taxas de invasão foram quantificadas por citometria de fluxo. Controles não tratados e/ou não infectados foram incluídos. Os dados correspondem às médias das triplicatas \pm DP, foram analisados com one-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Dunn) ou teste t de Student (Mann-Whitney two-tailed test). $P \leq 0,05$ foi considerado significativo. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Os dados são provenientes de até três experimentos independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. Os valores p estão indicados nas figuras. MFI = intensidade mediana de fluorescência.

4.4. Infecção por *T. cruzi* resulta na ativação da Caspase-7 e na clivagem proteolítica da Fosfolipase C γ 1 em células B

Alguns estudos em camundongos estabeleceram que a infecção por *T. cruzi* induziu uma acentuada diminuição das células B imaturas na medula óssea (ACOSTA RODRIGUEZ et al., 2007; ZUNIGA et al., 2005). Para estudar a influência direta da infecção por *T. cruzi* sobre a proliferação das células B, ensaios de invasão foram conduzidos. Após 2 horas de invasão as células foram lavadas para remover os parasitas livres, células não infectadas foram usadas como controle negativo e foram lavadas da mesma maneira. Células infectadas e não infectadas foram contadas em câmara de Neubauer em diferentes tempos após a invasão (2, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas); os resultados mostram que as células infectadas possuem uma baixíssima taxa de proliferação, por outro lado as células não infectadas proliferam significativamente (Figura 9 E). Ainda, detectou-se no grupo infectado, por meio de microscopia de luz, uma quantidade considerável de debris e também parasitas extracelulares, que apareceram posteriormente às lavagens (dados não mostrados). Hipotetizou-se que após o tempo de invasão e as seguidas lavagens, os parasitas que apareciam no sobrenadante no decorrer do tempo estavam saindo das células infectadas, para testar essa hipótese o experimento foi repetido e, após 2 horas de invasão e diversas lavagens, os parasitas livres que surgiam ao longo dos tempos indicados eram contados em câmara de Neubauer. Os resultados mostram (Figura 9 F) dois picos de grande quantidade de parasitas que saíram das células e retornaram para o sobrenadante (3 e 24 horas após a infecção), seguidos de dois pontos em que o número de parasitas livres eram baixos (6 e 48 horas). Isso sugere que *T. cruzi* de algum modo interfere na proliferação das células B, que por sua vez não retém o parasita em seu interior, permitindo que eles escapem para o meio extracelular para infectar novamente as células em tempos posteriores. Ainda, a presença de debris sugere fortemente que o parasita induz diretamente a morte dessas células.

Para investigar se *T. cruzi* ativa a via de sinalização da PLC assim como para avaliar a se a infecção resulta na morte das células B, ensaios de invasão e western blotting foram

conduzidos avaliando a ativação da PLC γ 1 e também a ativação das proteínas executoras da apoptose, Caspase-3 e Caspase-7. Infelizmente, após varias tentativas não foi possível detectar a ativação da PLC γ 1, porém ao avaliar a proteína total detectou-se que a infecção por *T. cruzi* resultava na clivagem proteolítica da PLC γ 1 produzindo um fragmento de 76 kDa (Figura 9 G). Para avaliar se a infecção por *T. cruzi* resultava na apoptose das células B, avaliou-se a ativação das Caspases-3 e 7. A Figura 9 G também mostra que a infecção por *T. cruzi* ativa a Caspase-7 em células B, mas não a Caspase-3. Estes resultados sugerem que a infecção por *T. cruzi* induz apoptose das células B por ativar a Caspase-7, que por sua vez causa a clivagem proteolítica da PLC γ 1 total (Figura 9 G e H).

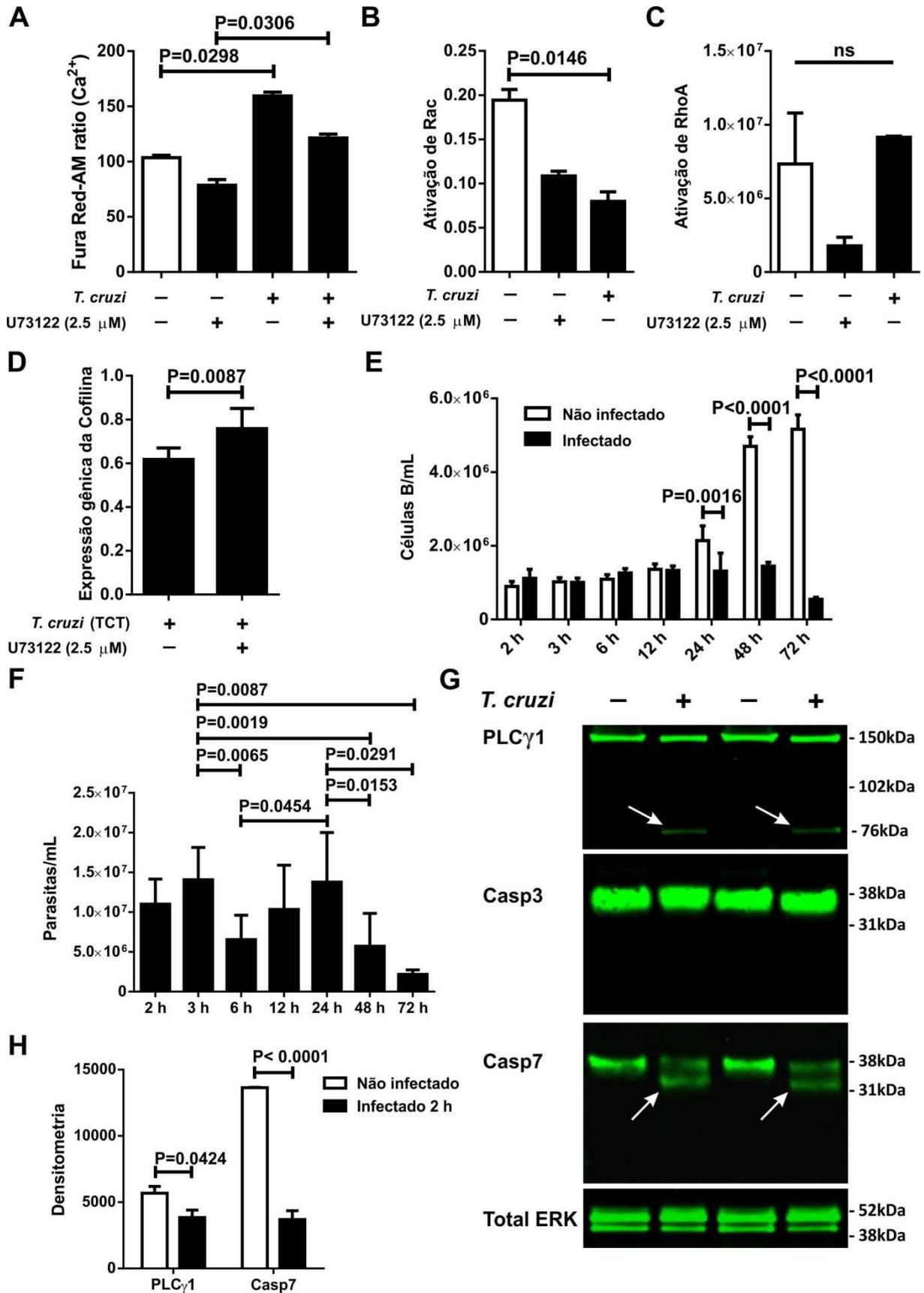


Figura 9. *T. cruzi* ativa Caspase-7 e induz a clivagem proteolítica da Fosfolipase $C\gamma 1$ durante a invasão das células B. (A) Células Namalwa infectadas ou não por *T. cruzi* foram pré-tratadas ou não com U73122 e a concentração citosólica de cálcio livre foi avaliada usando a sonda de Fura Red-AM após 2 horas de infecção. (B)

e C) células Namalwa pré-tratadas ou não com U73122, foram infectadas ou não por *T. cruzi*, os níveis de ativação da (B) Rac e (C) RhoA GTPases foram avaliados usando o kit G-LISA. (D) Expressão do RNAm da Cofilina por células Namalwa infectadas, pré-tratadas ou não com U73122 durante 2 horas, avaliada por qPCR. (E) Células Namalwa foram infectadas ou não por *T. cruzi* (2 h, 10 parasitas por célula), lavadas para remover parasitas extracelulares e o número de células (grupo infectado e controle negativo) bem como (F) o número de parasitas que saíram das células hospedeiras foram contados, usando câmara de Neubauer, nos tempos indicados. (G e H) Western blotting usando anticorpos anti-PLC γ 1, anti-Caspase-3 e anti-Caspase-7 em extratos de células Namalwa infectadas ou não por *T. cruzi* (2 h, 10 parasitas por célula). O anticorpo anti-ERK foi utilizado como controle de *loading*. Os dados correspondem às médias das triplicatas \pm DP e foram analisados com one-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Dunn), teste t de Student (Mann-Whitney two-tailed test) ou two-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Sidak). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. ns = não significativo. Os dados são provenientes de até três experimentos independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. Os valores p estão indicados nas figuras.

4.5. Células B não suportam o parasitismo e sofrem morte celular

Para demonstrar a capacidade do *T. cruzi* de induzir diretamente a morte de células B durante a infecção, ensaios de invasão e viabilidade celular com resazurina foram conduzidos em células infectadas ou não pelo parasita. Os resultados das análises demonstram que após 2 horas de infecção a viabilidade das células infectadas reduziu significativamente para em torno de 60% de células viáveis (Figura 10 A). Para avaliar se componentes secretados pelo parasita assim como componentes de superfície poderiam interferir na viabilidade celular, células B não infectadas foram tratadas com o sobrenadante das células infectadas (Figura 10 B) ou com extratos de *T. cruzi* lisado (Figura 10 C) por duas horas, os resultados mostram que somente células B tratadas com o sobrenadante das células infectadas tiveram sua viabilidade celular significativamente reduzida (em torno de 80% de células viáveis), parasitas lisados não demonstrou nenhum efeito.

Para avaliar qual sub-rota de morte celular (apoptose inicial, apoptose tardia ou morte celular) estava predominantemente sendo ativada em células B durante a infecção por *T. cruzi*, ensaios de invasão foram conduzidos. As células B foram analisadas utilizando-se o kit de marcação de células apoptóticas por anexina V e quantificadas por citometria de fluxo (Figura 10 D-I), os resultados mostram que as sub-rotas de morte celular ativadas em células B infectadas por *T. cruzi* foram apoptose tardia e morte celular (Figura 10 J). Para avaliar se a morte de células B induzida por *T. cruzi* era dependente do tempo de exposição ao parasita, uma cinética de invasão com diferentes tempos de exposição (2, 6, 12, 24 e 48 horas) ao parasita foi conduzida, ao final de cada tempo as células infectadas e controles negativos foram marcadas com iodeto de propídio e a MFI foi quantificada por citometria de fluxo; os resultados obtidos com esse ensaio confirmaram os resultados mencionados acima, mostrando que a morte celular das células B é dependente do tempo de exposição ao parasita (Figura 10 K). Coletivamente, esses dados sugerem que a invasão por *T. cruzi* pode induzir diretamente a

morte celular das células B sendo esse um processo dependente do tempo de exposição ao parasita; também, produtos secretados no sobrenadante pelo parasita durante a infecção reduzem a viabilidade dessas células.

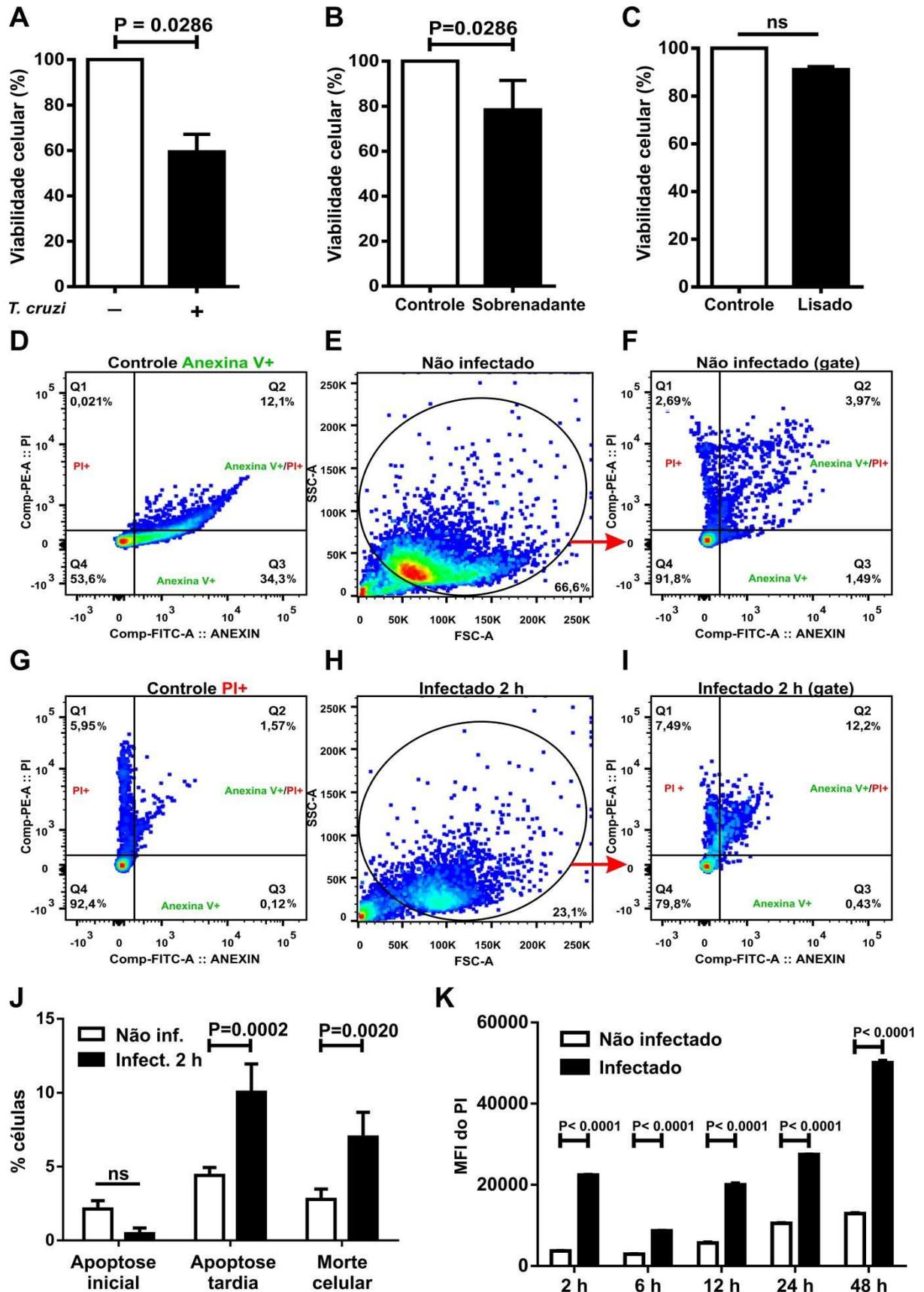


Figura 10. Células B infectadas por *T. cruzi* sofrem apoptose tardia e morte celular. (A-C) Células Namalwa B foram submetidas a três situações distintas: (A) infectadas ou não com uma mistura de tripomastigotas e amastigotas (2 h, relação parasita / célula 10: 1); (B) tratados ou não durante 2 h com o

sobrenadante do ensaio de invasão (livre de células e parasitas); (C) tratados ou não durante 2 h com extratos de *T. cruzi* lisado. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada em cada situação usando resazurina. Células Namalwa (D-J) foram infectadas ou não por *T. cruzi* (2 h, relação parasita / célula 10: 1) e as proporções de morte celular (PI+), apoptose inicial (Anexina V+) e apoptose tardia (Anexina V+/PI+) foram determinadas por citometria de fluxo; (D) Controle de células anexina V+, (E e F) controle não infectado, (G) controle de células PI+, (H e I) células infectadas, (J) porcentagem de células PI+ (morte celular), anexina V+ (apoptose precoce) e duplamente marcadas (apoptose tardia). (K) células Namalwa foram incubadas com *T. cruzi* durante os períodos de tempo indicados, lavadas, tratadas com solução de PI durante 30 minutos e o MFI do PI foi quantificado por citometria de fluxo em células infectadas e no controle negativo. Os dados correspondem às médias das triplicatas \pm DP e foram analisados com o teste t de Student (Mann-Whitney two-tailed test) ou two-way ANOVA (teste de comparações múltiplas de Sidak). Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. ns = não significativo. Os dados são provenientes de até três experimentos independentes. As barras de erro representam o desvio padrão. Os valores p estão indicados nas figuras. PI = iodeto de propídio.

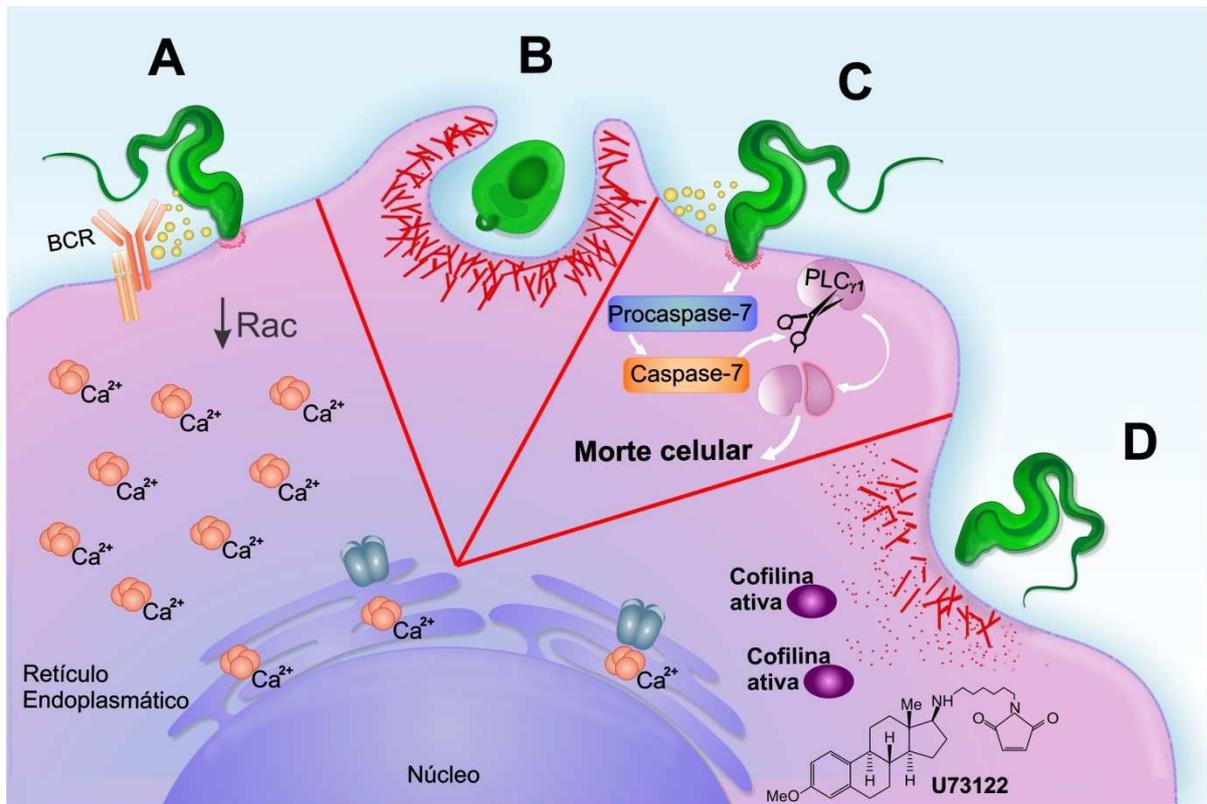


Figura 11. Resumo Gráfico. (A) A infecção das células B por *T. cruzi* promoveu o aumento da concentração citosólica do cálcio na célula hospedeira. (B) *T. cruzi* induziu a formação de prolongamentos da membrana celular, ricos em actina, durante a invasão das células B. (C) Infecção por *T. cruzi* resultou em morte das células B por ativação da Caspase-7 e clivagem proteolítica de PLC γ 1. (D) Durante a invasão das células B o parasita induz despolimerização do citoesqueleto de actina dessas células; o tratamento das células B com U73122 (inibidor de PLC) induziu elevação da expressão relativa do RNAm da Cofilina assim como despolimerização do citoesqueleto de actina aumentando a invasão por *T. cruzi*. PLC = Fosfolipase C. Fonte: autores.

5. DISCUSSÃO

T. cruzi possui a habilidade de invadir e replicar em diferentes tipos de células nucleadas de mamíferos (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Independentemente das células alvo terem capacidade fagocítica (macrófagos), ou não (fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, musculares e nervos), elas são hospedeiras

em potencial do parasita (SCHENKMAN; ROBBINS; NUSSENZWEIG, 1991), que demonstra ter tropismo por cardiomiócitos e células da musculatura lisa (WOOLSEY et al., 2003). O presente estudo inclui as células B na lista de hospedeiras da infecção direta por *T. cruzi*, porém diferente dos tipos celulares citados anteriormente, as quais suportam o ciclo de replicação do parasita, as células B não resistem ao parasitismo e sofrem morte celular. Os resultados descritos neste estudo sugerem que a infecção direta e morte das células B são eventos de um mecanismo estratégico que beneficia o parasita permitindo sua evasão da resposta imune e persistência no hospedeiro.

Desde o início da década de 1990 pensava-se que *T. cruzi* não era capaz de infectar as células B (VELGE et al., 1991), além disso, o potencial envolvimento das células B na patogenia da doença de Chagas tem sido ofuscado pela ênfase que os pesquisadores davam ao estudo das células T (FERNÁNDEZ et al., 2014). Entretanto, os resultados aqui descritos contribuem para esclarecer esse envolvimento, revelando que *T. cruzi* possui a capacidade de infectar células B *in vivo* e *in vitro*. Análises por citometria de fluxo detectaram células B infectadas pelo parasita tanto no modelo animal de infecção experimental quanto nos ensaios de invasão das células Namalwa, a carga parasitária também pôde ser quantificada satisfatoriamente em ambos os ensaios.

As imagens obtidas por microscopia de luz mostram claramente as células Namalwa, coradas com Giemsa, contendo parasitas internalizados; eles são vistos no interior das células com um halo claro ao seu redor, esse é um detalhe que diferencia parasitas internalizados daqueles apenas aderidos à superfície celular (BRENER, 1973; FERNANDES et al., 2011). Da mesma forma, as imagens de RIFI confirmam a infecção, com a vantagem de permitir a visualização do citoesqueleto de actina das células; as diferenças na integridade da actina cortical nos grupos infectado e controle negativo geraram questionamentos sobre os meios pelos quais o parasita interage e modifica o citoesqueleto durante o processo de infecção. Pensando nisso, ensaios de invasão foram conduzidos e algumas drogas que agem sobre o citoesqueleto de actina foram utilizadas, tendo em vista estudar as alterações que o parasita provoca no citoesqueleto durante a invasão assim como esclarecer de que forma essas alterações favorecem a internalização do parasita.

Considerando a importância das células B, na proteção contra infecções assim como sua atuação versátil na resposta imune, não é surpresa que a manipulação dessas células por patógenos proporciona uma vantagem seletiva a favor da infecção. Vários patógenos exercem efeitos consideráveis sobre as células B tanto em modelos animais quanto em humanos. Vírus e bactérias intracelulares são capazes de infectar e persistir no interior das células hospedeiras,

levantando possibilidade de que as células B também possam ser reservatórios para diferentes patógenos. Um dos vírus que sabidamente infecta células B é o Epstein-Barr, como resultado da infecção as células B tornam-se latentes, permitindo que o vírus se esconda da resposta imune humoral, dissemine e persista no hospedeiro; bactérias patogênicas Gram-negativas (*Brucella* spp., *Moraxella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. e *Shigella* spp.) assim como Gram-positivas (*Listeria* spp.), também podem infectar células B por invasão ativa, isso demonstra que alguns patógenos aprimoraram mecanismos que forçam sua entrada nas células B, que por sua vez tornam-se um reservatório intracelular (NOTHELFER; SANSONETTI; PHALIPON, 2015).

O pré-tratamento das células Namalwa com U73122, um inibidor farmacológico de PLC, resultou em despolimerização do citoesqueleto de modo semelhante ao tratamento com Citocalasina D, como consequência a infecção pelo parasita foi potencializada em ambos os tratamentos. Isso indica que, o citoesqueleto de actina age como uma barreira física que dificulta a infecção, a qual é favorecida e potencializada quando ocorre despolimerização da actina cortical. Uma das características da infecção de células não fagocíticas por *T. cruzi* é a facilitação do processo pela despolimerização do citoesqueleto de actina das células hospedeiras (WOOLSEY; BURLEIGH, 2004). Estudos prévios afirmam que a infecção por *T. cruzi* é independente do citoesqueleto da célula e o tratamento delas com Citocalasina D, uma droga que despolimeriza filamentos de actina, não aumentou a invasão por tripomastigotas (SCHENKMAN; ROBBINS; NUSSENZWEIG, 1991) nem amastigotas (PROCÓPIO et al., 1998). Por outro lado, vários estudos fornecem fortes evidências de que o pré-tratamento com Citocalasina D de fato aumenta a invasão por *T. cruzi* devido à despolimerização dos microfilamentos de actina cortical das células hospedeiras, promovendo a internalização do parasita de modo dependente ou independente da via lisossomal (TARDIEUX et al., 1992; WOOLSEY et al., 2003).

Constata-se que a literatura científica fornece opiniões contraditórias, o tempo de tratamento ou de infecção, o tipo celular, a forma de desenvolvimento do parasita assim como a cepa utilizada varia entre os estudos (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Os resultados descritos nesse trabalho estão em concordância com o consenso geral, de que a despolimerização facilita a invasão do parasita, pois esse fenômeno também foi observado nos ensaios com células B. Também, na invasão das células B, *T. cruzi* induziu a formação de prolongamentos membranares ricos em actina no sítio de infecção, esse fenômeno foi similar ao observado em outros estudos que empregaram tipos celulares diferentes nos ensaios de

invasão, estando em concordância com os mesmos (BONFIM-MELO et al., 2015; MORTARA et al., 2005, 2008; PROCÓPIO; BARROS; MORTARA, 1999).

A Fosfolipase C (PLC) exerce um papel fundamental na sinalização celular iniciada pela ativação de receptores na superfície celular por patógenos ou parasitas; a PLC hidrolisa Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) produzindo Diacilglicerol (DAG) e Trifosfato de inositol (IP₃) que, por sua vez, induz o aumento de cálcio citosólico. Os resultados sugerem que tratamento das células B com U73122, inibidor farmacológico de PLC, promove o aumento da expressão gênica relativa do RNAm da Cofilina, uma proteína que corta filamentos de actina (BAMBURG; BERNSTEIN, 2010). Em células B, a ativação do receptor BCR por antígenos solúveis ou associados à membrana de patógenos promove a desfosforilação e, conseqüentemente, a ativação da Cofilina, que corta e despolimeriza a rede de F-actina cortical pelo lado citoplasmático (SONG; LIU; UPADHYAYA, 2014).

Os resultados também mostram que *T. cruzi* por si só induz despolimerização generalizada da actina cortical das células B; a explicação sugerida para isso é que durante a invasão o parasita promove o aumento da concentração citosólica de cálcio nas células B. *T. cruzi* ativa mecanismos que aumentam a concentração de cálcio intracelular, em seguida lisossomos são recrutados para a membrana plasmática e se fundem de forma dependente de cálcio, disponibilizando membrana para o vacúolo parasitóforo nascente (ANDREWS, 2002; TARDIEUX et al., 1992; WOOLSEY et al., 2003); o aumento da concentração de cálcio intracelular induzida por *T. cruzi* é um fator que não só induz despolimerização da actina cortical, mas também facilita a fusão dos lisossomos com a membrana plasmática promovendo a invasão do parasita em diversos tipos celulares (BURLEIGH et al., 1997; RODRÍGUEZ et al., 1995; SCHARFSTEIN et al., 2000; TARDIEUX et al., 1992; TARDIEUX; NATHANSON; ANDREWS, 1994; WOOLSEY et al., 2003).

T. cruzi também diminuiu a ativação da Rac GTPase nas células B, sendo este outro fator que contribuiu para a despolimerização da actina cortical e promoveu a invasão pelo parasita. Proteínas da família Rho de GTPases controlam a organização do citoesqueleto de actina em todas as células eucarióticas; um exemplo é a Rac GTPase que quando ativada promove a polimerização da actina na periferia das células formando lamelipódios (MACKAY, 1998). Rac e Rho exercem controles separados na dinâmica do citoesqueleto de actina das células, quando Rac e Rho tem baixa atividade, a polimerização de actina ocorre em níveis baixos (MACHESKY; HALL, 1997), logo a Rac é um fator essencial necessário ao rearranjo do citoesqueleto (RIDLEY, 2006).

O controle da infecção por *T. cruzi* depende da eliminação do parasita pelos mecanismos de defesa da imunidade inata e adquirida; macrófagos, células NK, células T e B integram o arsenal necessário para promover a resposta imune adequada e controlar a disseminação do patógeno. Porém, a depleção ou ausência de algum dos componentes efetores desse arsenal resulta na suscetibilidade à doença (BRYAN; GUYACH; NORRIS, 2010). Os resultados descritos no presente estudo indicam que na infecção por *T. cruzi* ocorre depleção das células B devido à invasão direta destas células pelo parasita, as quais não suportam o parasitismo e sofrem morte celular. Como as células B exercem um papel versátil e fundamental no combate a infecções, a eliminação direta delas pelo parasita é uma estratégia vencedora que promove o aumento da parasitemia e a persistência crônica do parasita no hospedeiro.

Como descrito acima, os resultados sugerem que durante o processo de infecção das células B o parasita induz a despolimerização do citoesqueleto de actina dessas células para se internalizar. Porém, as células B são incapazes de reter o parasita em seu interior e permitem seu retorno para o meio extracelular para, em seguida, sofrerem novos episódios de infecção e saída em tempos posteriores. Isso está em concordância com estudos prévios, os quais mostram que a despolimerização prolongada dos microfilamentos de actina resulta na saída de parasitas de dentro das células hospedeiras, pois a retenção do parasita no meio intracelular é dependente da polimerização da actina após a internalização (WOOLSEY; BURLEIGH, 2004). Outro estudo obteve resultados similares aos aqui relacionados, concluindo que o citoesqueleto de actina representa uma barreira física e seu rompimento promove a invasão por *T. cruzi* por facilitar sua invaginação a partir da membrana celular, mas também permite a subsequente saída dos parasitas para o meio extracelular, onde permanecem viáveis e prontos para novos eventos de invasão (ANDRADE; ANDREWS, 2004).

Finalmente, os resultados aqui descritos, além de demonstrarem que *T. cruzi* infecta e promove diretamente a morte das células B, também revelam que o mecanismo intracelular pelo qual isso ocorre envolve a ativação da Caspase-7, que por sua vez causa a clivagem proteolítica da PLC γ 1 resultando em apoptose e morte celular. Esse mecanismo foi descrito pela primeira vez em outro estudo prévio, os autores trabalhando com células Molt-4 (linfoma de células T humanas) demonstraram que a PLC γ 1 era clivada por Caspases do grupo II (Caspase-3 e Caspase-7) durante o processo de apoptose induzido pelo tratamento dessas células com etoposídeo, ceramidas ou TNF- α (BAE et al., 2000). A identificação dos mecanismos que governam a morte celular dos linfócitos representa um dos principais desafios da pesquisa biomédica (ACOSTA RODRIGUEZ et al., 2007).

T. cruzi demonstra ter desenvolvido diversas estratégias para evadir da resposta imune do hospedeiro, algumas delas envolvendo o ataque às células B em diferentes fases do seu desenvolvimento. A infecção por *T. cruzi* induz uma acentuada perda de células B imaturas na medula óssea comprometendo também células B que migraram recentemente para órgãos periféricos, a perda dessas células imaturas da medula óssea está associada a uma elevada taxa de apoptose por um mecanismo dependente de células mieloides CD11b⁺ que secretam produtos da via da ciclooxigenase, resultando em morte celular (ACOSTA RODRIGUEZ et al., 2007; ZUNIGA et al., 2005). Estudos em camundongos submetidos à infecção experimental por *T. cruzi* demonstram que as células B do baço apresentam uma elevada taxa de apoptose correlacionada com aumento na expressão de Fas e FasL em células B altamente ativadas, a infecção induz as células B a cometerem “fratricídio” por um mecanismo mediado por Fas/FasL que acomete preferencialmente células que produzem anticorpos específicos contra o parasita (ZUNIGA et al., 2002); porém, esse mesmo estudo não descarta a possibilidade de outros mecanismos apoptóticos também contribuírem para a redução do número de células B (ACOSTA RODRIGUEZ et al., 2007).

Ao mesmo tempo em que a infecção por *T. cruzi* induz uma acentuada diminuição das células B da medula óssea, o baço apresenta hiperplasia como consequência da ativação policlonal das células B sendo este outro mecanismo induzido pelo parasita para escapar da resposta imune específica do hospedeiro, diluindo os anticorpos específicos circulantes, enquanto ocorre um acentuado aumento na produção de anticorpos inespecíficos (ACOSTA RODRIGUEZ et al., 2007). Também, a infecção aguda por *T. cruzi* é caracterizada por múltiplas manifestações de imunossupressão da resposta humoral e celular; embora anticorpos específicos sejam essenciais para controlar a infecção, tem sido proposto que a imunossupressão humoral a antígenos do parasita pode ser devido ao fato de que o número de células B que produzem anticorpos específicos é sobrepujado por células B policlonais ativadas produtoras de anticorpos inespecíficos. Isso indica que a estimulação contínua das células B resulta em disfunção, ou seja, perda da habilidade de responder a antígenos (anergia) e também a uma taxa de apoptose aumentada (ZUNIGA et al., 2000).

O presente estudo demonstrou que a invasão direta das células B por *T. cruzi* é outra estratégia bem sucedida empregada pelo parasita para evadir do sistema imunológico. Estudos prévios não puderam estabelecer que o parasita pudesse diretamente induzir a morte das células B (ACOSTA RODRIGUEZ et al., 2007).

6. CONCLUSÕES

Com este estudo fica demonstrada a capacidade de *Trypanosoma cruzi* de infectar células B. Até a conclusão deste a infecção de células B por *T. cruzi* ainda não havia sido detectada por estudos prévios. Para infectar as células B, o parasita estimula alguns dos mesmos eventos celulares observados na invasão de outros tipos de células, que favorecem sua internalização:

- Aumento da polimerização do citoesqueleto de actina no sítio de invasão, promovendo a formação de prolongamentos ricos em F-actina ao redor do parasita;
- Aumento da concentração de $[Ca^{2+}]$ citosólico na célula hospedeira, resultando em despolimerização geral do citoesqueleto de actina, reduzindo a barreira física que dificulta a internalização nas células;
- Utilizando drogas que diminuem a polimerização do citoesqueleto de actina observou-se que a invasão das células B por *T. cruzi* é potencializada; este é um resultado que ajuda a fundamentar o consenso geral de que o citoesqueleto é uma barreira física que dificulta a invasão celular.

Também, este estudo revela que as células B não suportam o parasitismo e sofrem morte celular devido à infecção. O mecanismo no qual o parasita causa morte de células B envolve a ativação da Caspase-7 e clivagem proteolítica da PLC γ 1. Este mecanismo já foi descrito em estudos prévios que não envolveram infecção por *T. cruzi*, sendo uma novidade no estudo da relação patógeno-hospedeiro. Eliminar células B favorece o parasita de algumas maneiras: induz um estado de imunossupressão humoral, leva à ativação policlonal de células B em detrimento de uma resposta imune específica, limita a produção de anticorpos, favorece a replicação e persistência do parasita no hospedeiro resultando na cronificação da doença.

De modo geral, estes resultados contribuem para o entendimento da biologia das células B no contexto da infecção por protozoários, o que é necessário na elaboração de intervenções e estratégias imunológicas que potencializem a resposta imune protetora. Contribuem também com novos elementos que ajudam a esclarecer os mecanismos que favorecem *T. cruzi* na evasão da resposta imunológica do hospedeiro e promover a cronificação da doença.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA RODRIGUEZ, E. V. et al. *Trypanosoma cruzi* infection beats the B-cell compartment favouring parasite establishment: Can we strike first? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 137–142, 2007.
- AMEZCUA VESELY, M. C. et al. B-cell response during protozoan parasite infections. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 9, p. 1135–1143, 2004.
- ANDREWS, N. W. Lysosomes and the plasma membrane: Trypanosomes reveal a secret relationship. **Journal of Cell Biology**, v. 158, n. 3, p. 389–394, 2002.
- BAE, S. S. et al. Proteolytic cleavage of phospholipase C γ 1 during apoptosis in Molt-4 cells. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 9, p. 1083–1092, 2000.
- BAMBURG, J. R.; BERNSTEIN, B. W. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. **Biology Reports**, v. 23410, n. August, p. 62–2, 2010.
- BASSO, K.; DALLA-FAVERA, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 172–184, 2015.
- BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas Cardiomyopathy. **Cardiology Clinics**, v. 35, n. 1, p. 31–47, 2017.
- BERMEJO, D. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. **Immunology**, v. 132, n. 1, p. 123–133, 2011.
- BONFIM-MELO, A. et al. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes trigger the protein kinase D1-cortactin-actin pathway during cell invasion. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 1797–1810, 2015.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosma cruzi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 27, p.347-382, 1973.
- BRYAN, M. A.; GUYACH, S. E.; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B Cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, 2010.
- BURLEIGH, B. A. et al. A Cytosolic Serine Endopeptidase from. **The Journal of Cell Biology**, v. 136, n. 3, p. 609–620, 1997.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of Mammalian Cells. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 175–200, 1995.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 4, p. 461–465, 1998.

CARDOSO, M. S.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 1–15, 2016.

COOPER, M. D. The early history of B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 191–197, 2015.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

CROTTY, S. A brief history of T cell help to B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 185–189, 2015.

CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

MACKAY, D. J. G.; HALL, A. Rho GTPases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 33, 20685–20688, 1998.

DA SILVA, C. V. et al. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 563–570, 2009.

DE SILVA, N. S.; KLEIN, U. Dynamics of B cells in germinal centres. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 137–148, 2015.

DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi***. [s.l.: s.n.]. v. 86

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269–85, 2002.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.

FERNANDES, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 909–921, 2011.

FERNÁNDEZ, E. R. et al. Altered distribution of peripheral blood memory B cells in humans chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F. G.; CHALASANI, G. B cells, antibodies, and more. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 137–154, 2016.

- HOWARD, E. J. et al. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 121, n. 1, p. 22–33, 2014.
- JABARI, S. et al. Chagasic megacolon: Enteric neurons and related structures. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 142, n. 3, p. 235–244, 2014.
- KRANSDORF, E. P.; ZAKOWSKI, P. C.; KOBASHIGAWA, J. A. Chagas disease in solid organ and heart transplantation. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 418–424, 2014.
- KUROSAKI, T.; KOMETANI, K.; ISE, W. Memory B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 149–159, 2015.
- LEBIEN, T. W.; TEDDER, T. F. ASH 50th anniversary review B lymphocytes : how they develop and function. **The american society of hematology**, v. 112, n. 5, p. 1570–1580, 2008.
- LIMA, F. M. et al. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 837–843, 2010.
- MACHESKY, L. M.; HALL, A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. **Journal of Cell Biology**, v. 138, n. 4, p. 913–926, 1997.
- MADDALY, R. et al. Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation - Insights from both in vivo and in vitro approaches. **FEBS Letters**, v. 584, n. 24, p. 4883–4894, 2010.
- MAUS, M. et al. B cell receptor-induced Ca²⁺ mobilization mediates F-actin rearrangements and is indispensable for adhesion and spreading of B lymphocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. April, p. 537–47, 2013.
- MORTARA, R. A. et al. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 77, n. 1, p. 77–94, 2005.
- MORTARA, R. A. et al. Host Cell Actin Remodeling in Response to *Trypanosoma cruzi* : Trypomastigote Versus Amastigote Entry. **Molecular Mechanism of Parasite Invasion**, p. 101–19, 2008.
- MURTA, S. M. F. et al. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 203–214, 1998.
- NAKAYASU, E. S. et al. **Proteomics**. v. 9, n. 13, p. 3489–3506, 2009.
- NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction

pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 4, p. 405–414, 2002.

NOTHELPER, K.; SANSONETTI, P. J.; PHALIPON, A. Pathogen manipulation of B cells : the best defence is a good offence. **Nature Publishing Group**, n. February, 2015.

NUTT, S. L. et al. The generation of antibody-secreting plasma cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 160–171, 2015.

PIEPER, K.; GRIMBACHER, B.; EIBEL, H. B-cell biology and development. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 4, p. 959–971, 2013.

PROCÓPIO, D. O. et al. *Trypanosoma cruzi*: Effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 1–13, 1998.

PROCÓPIO, D. O.; BARROS, H. C.; MORTARA, R. A. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **European journal of cell biology**, v. 78, n. 12, p. 911–924, 1999.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RIDLEY, A. J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. **Trends in Cell Biology**, v. 16, n. 10, p. 522–529, 2006.

RODRÍGUEZ, A. et al. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1263–1273, 1995.

ROSSER, E. C.; MAURI, C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 607–612, 2015.

SCHARFSTEIN, J. et al. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 9, p. 1289–1300, 2000.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 2, p. 645–654, 1991.

SCHMUÑIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, n. 6, p. 547–57, 1991.

SONG, W.; LIU, C.; UPADHYAYA, A. The pivotal position of the actin cytoskeleton in the initiation and regulation of B cell receptor activation. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 2, p. 569–578, 2014.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The Burden of Chagas Disease Estimates and Challenges.

Global Heart, v. 10, n. 3, p. 139–144, 2015.

TARDIEUX, I. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, v. 71, n. 7, p. 1117–1130, 1992.

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M. H.; ANDREWS, N. W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 3, p. 1017–22, 1994.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592–630, 2011.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: Controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495–501, 2003.

VELGE, P. et al. *Trypanosoma cruzi*: infection of T lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. **European journal of immunology**, v. 21, n. 9, p. 2145–52, 1991.

WOOLSEY, A. M. et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of cell science**, v. 116, n. Pt 17, p. 3611–3622, 2003.

WOOLSEY, A. M.; BURLEIGH, B. A. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 829–838, 2004.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 105–109, 2008.

ZHANG, Y.; GARCIA-IBANEZ, L.; TOELLNER, K. M. Regulation of germinal center B-cell differentiation. **Immunological Reviews**, v. 270, n. 1, p. 8–19, 2016.

ZUÑIGA, E. et al. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression : B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 119, p. 507-515, 2000.

ZUÑIGA, E. et al. Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: Involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1849–1858, 2005.

ZUÑIGA, E. et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Selectively Renders Parasite-Specific IgG+ B Lymphocytes Susceptible to Fas/Fas Ligand-Mediated Fratricide. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 3965-3973, 2002.

8. ANEXOS

Anexo I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 052/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 105/10

Projeto Pesquisa: “Estudos do papel do citoesqueleto de actina, de citocinas e da proteína P21 de T. cruzi na evolução para a fase crônica da doença de chagas experimental”.

Pesquisador Responsável: Cláudio Vieira da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 17 de maio de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU