

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO**

**“ AUTOANTICORPOS CONTRA CÉLULAS APOPTÓTICAS  
MODULAM O CRESCIMENTO DO *TRYPANOSOMA CRUZI*  
EM MACRÓFAGOS.”**

Geisy Monteiro de Almeida  
Orientador: Prof. George Alexandre dos Reis

Rio de Janeiro  
2007

# **Livros Grátis**

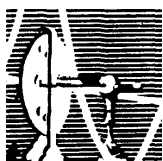
<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Geisy Monteiro de Almeida

“Autoanticorpos contra Células Apoptóticas  
Modulam o crescimento do *Trypanosoma cruzi* em  
macrófagos”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE  
JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho  
2007

ALMEIDA, Geisy Monteiro de

Autoanticorpos contra Células Apoptóticas Modulam o crescimento do *Trypanosoma cruzi* em macrófagos.

p.i-xii, 98.

Tese: Doutorado em Ciências Biológicas (Biofísica)

1- *Trypanosoma cruzi*

2- Células apoptóticas

3- Autoanticorpos

4- Macrófagos

## AUTOANTICORPOS CONTRA CÉLULAS APOPTÓTICAS MODULAM O CRESCIMENTO DO *Trypanosoma cruzi* EM MACRÓFAGOS

Orientador: George Alexandre dos Reis

Aluna: Geisy Monteiro de Almeida

A produção de Autoanticorpos é induzida no curso da doença de Chagas. Células apoptóticas podem ser um alvo potencial para esses autoanticorpos, desde que a apoptose de linfócitos é freqüente no curso da infecção pelo *T. cruzi*. A co-cultura de macrófagos de BALB com linfócitos singênicos apoptóticos aumentou marcadamente a replicação do *T. cruzi*. Quando células apoptóticas foram pré-incubadas com soro crônico chagásico, a replicação do *T. cruzi* foi reduzida, concomitante com um aumento na produção de TNF- $\alpha$ , e redução na produção de TGF- $\beta$ . Desta forma, resolvemos investigar a presença de autoanticorpos contra células apoptóticas na infecção pelo *T. cruzi*, e seu papel na replicação do parasita. A infecção induziu a produção de autoanticorpos IgM e IgG reativos com linfócitos apoptóticos. A IgG purificada do soro de camundongo cronicamente infectado com *T. cruzi*, mas não de camundongo normal, opsonizou os linfócitos apoptóticos para a fagocitose. A interação com linfócitos apoptóticos opsonizados aumentou a produção de TNF- $\alpha$ , e reduziu a secreção de TGF- $\beta$ 1 por macrófagos infectados, e levou ao controle da replicação do parasita de maneira dependente do TNF- $\alpha$ . O efeito protetor da IgG chagásica depende dos receptores Fc $\gamma$ , já que para o controle da replicação do parasita é requerida a porção Fc da IgG intacta, e pode ser abolida pelo fragmento Fab do anti-CD16/CD32. Esses resultados indicam que anticorpos contra células apoptóticas que são produzidos durante a infecção pelo *T. cruzi* podem ter um papel protetor no controle da replicação do parasita por macrófagos.

Palavras Chaves: *Trypanosoma cruzi*, doença Chagas, Macrófagos, Linfócitos, Apoptose, Fagocitose, TGF-beta, TNF-alfa, Autoanticorpos, Receptores Fc

Rio de Janeiro  
2007

AUTOANTIBODIES TARGET APOPTOTIC CELLS MODULATE *Trypanosoma cruzi* GROWTH IN MACROPHAGES

Orientador: George Alexandre dos Reis

Aluna: Geisy Monteiro de Almeida

Autoantibody production is induced in the course of Chagas disease. Apoptotic cells could be a potential target for such autoantibodies, since lymphocyte apoptosis is frequent in the course of *T. cruzi* infection. Co-culture of BALB macrophages with syngenic apoptotic lymphocytes markedly enhances *T. cruzi* replication. When apoptotic cells are pre-incubated with chronic chagasic serum, *T. cruzi* replication within macrophages is reduced, concomitant with an increase in TNF- $\alpha$  production, and a reduction in TGF- $\beta$  production. We investigated the presence of autoantibodies against apoptotic lymphocytes in *T. cruzi* infection, and a role in parasite replication. Infection induced IgM and IgG antibodies reactive with apoptotic lymphocytes. Purified IgG from mice chronically infected with *T. cruzi*, but not from normal mice, opsonized lymphocytes for phagocytosis. Interaction with opsonized lymphocytes increased production of TNF- $\alpha$ , but reduced production of TGF- $\beta$ 1 by infected macrophages, and led to TNF- $\alpha$  dependent control of parasite replication. The protective effect of chagasic IgG depended on Fc $\gamma$  Receptors, since control of parasite replication required an intact IgG Fc portion, and could be abrogated by an anti-CD16/CD32 Fab fragment. These results indicated that antibodies raised against apoptotic cells during *T. cruzi* infection could play a protective role in control of parasite replication by macrophages.

**Keywords:** Trypanosoma cruzi, Chagas disease, Macrophage, Lymphocytes, Apoptosis, Phagocytosis, TGF-beta, TNF-alpha, Autoantibodies, Fc receptors

Esta tese foi realizada no laboratório de Biologia Imunitária do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Prof. George Alexandre dos Reis.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX/MCT)

**Aos meus pais Edilene e Jones**

*“Depois de procelosa tempestade  
Noturna sombra e sibilante vento,  
Traz a manhã serena claridade,  
Esperança de porto e salvamento;  
Aparta o sol a negra escuridade,  
Removendo o temor ao pensamento.”*

Luís de Camões (Os Lusíadas)

*“Que belas as margens do rio possante,  
Que ao largo espumante campeia sem parar!...  
Ali das bromélias nas flores doiradas  
Há sifos e fadas, que fazem seu lar...*

*e, em lindos cardumes, sutis vaga-lumes*

*Acendem os lumes*

*P’ra o baile na flor.*

*E então\_\_ nas arcadas*

*Das pet’las doiradas,*

*Os grilos em festa*

*Começam na orquestra*

*Febris a tocar...*

*e as breves*

*Falenas*

*Vão leves,*

*Serenas,*

*Em bando*

*Girando,*

*Valsando,*

*Voando*

*No ar!...”*

Castro Alves (Os Escravos)



Ao meu marido Alexandre

*Et, puisque tôt ou tard l'amour humain s'oublie  
Il est d'une grande âme et d'un heureux destin  
D'aspirer comme toi pour un amour divin!  
Alfred de Musset*

## **Agradecimentos**

Sem dúvida a parte mais difícil e injusta deste trabalho, pois como pôr em palavras o grande sentimento de carinho e gratidão para com as pessoas que participaram do desenvolvimento dessa monografia direta ou indiretamente. Injusta porque nem todas as pessoas que contribuíram para a conclusão desse trabalho serão citadas, não pelo fato de sua contribuição ter sido menos importante mas pelo possível esquecimento em meio a tantas pessoas importantes no desfecho dessa tese.

- Aos meus pais que possibilitaram com carinho e educação a oportunidade de desenvolver esse trabalho, e que sempre me deram força e incentivo nas horas mais difíceis.
- Ao Dr. George A. Dos Reis pela orientação e oportunidade de trabalhar com pessoas altamente capacitadas. E por sua grande paciência em aguardar o término dessa tese.
- A Marise Nunes pela grande amizade, carinho, apoio e ajuda que foram cruciais para o término dessa tese.
- Aos amigos do laboratório que tornaram os dias de trabalho mais descontraídos.
- A grande amiga Flavia que foi imprescindível no desfecho dessa tese.
- Aos demais integrantes do laboratório que participaram direta ou indiretamente da realização desse trabalho.
- Ao Xandy pelo carinho, compreensão e atenção com os quais sempre me tratou, me dando força para concluir esse trabalho.

- As minhas filhas Nathália e Larissa que surgiram na minha vida durante a produção desse trabalho e me deram mais garra para concluí-lo.
  
- Aos meus amores Lucas, Camilla, Nathália e Larissa que enchem de alegria minha vida, tornando tudo mais prazeroso com seus sorrisinhos contagiantes.
  
- Aos meus irmãos Elijanes, e Júnior pelo carinho e incentivo que sempre me dispensaram, me dando força em momentos difíceis.
  
- A minha Vó Xica que sempre esteve a meu lado me dando apoio, carinho e me ajudando a seguir em frente.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- 1. ACK – Tampão de Lise**
- 2. AICD – Activation Induced Cell Death**
- 3. AIF – Apoptosis Inducing Factor**
- 4. APC – Célula Apresentadora de Antígeno**
- 5. Apaf-1 – Apoptosis Activation Factor 1**
- 6. Bcl<sub>2</sub> - B-cell leukemia/lymphoma 2**
- 7. Bid - Apoptosis-regulatory proteins**
- 8. CAD – Caspase Activated Dexoxyribonuclease**
- 9. c-FLIP - FLICE-inhibitory protein**
- 10. C1q - Subcomponent of complement 1 (C1)**
- 11. CD14- Receptor de LPS**
- 12. CD16 - Receptor de baixa afinidade para IgG agregado**
- 13. CD32 – Receptor de baixa afinidade FcRIIb**
- 14. CD36 – Receptor de trombospondina**
- 15. DISC – Death Inducing Sinaling Complex**
- 16. DNA – Ácido Dexoxirribonucléico**
- 17. ER – Retículo Endoplasmático**
- 18. FADD/Mort-1- Fas Associated Death Domain Protein**
- 19. Fas/ CD95 – Fas Death Receptor**
- 20. Fas-L –Fas-ligand**
- 21. FcγR- Receptor Fcγ**
- 22. GAS-6 – Ligante para o receptor tirosina quinase MER**
- 23. HBSS - Solução Salina Balanceada**
- 24. IAP – Inhibitor of Apoptosis Proteins**
- 25. IgG – Imunoglobulina G**
- 26. IgM – Imunoglobulina M**
- 27. IL-10 – Interleucina - 10**
- 28. LES – Lupus Eritematoso Sistêmico**
- 29. LOX-1 – Lectin –like Oxidized LDL Receptor-1**

- 30. LPS – Lipopolissacarídeo**
- 31. MBP - Proteína ligada a manose**
- 32. MFG-E8 – Protein Milk- Fat Globule Epidermal Growth Factor-8**
- 33. MER – Receptor Tirosina Quinase**
- 34. NO – Oxido Nitrico**
- 35. ODC – Ornitina descarboxilase**
- 36. Omi/ HTrA2 – Serina Protease Mitocondrial pro-apoptótica**
- 37. OxPLs – Fosfolípidios oxidados**
- 38. PAF - Platelet Activating Factor**
- 39. PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>**
- 40. PNPP- Paranitrofenol fosfato**
- 41. PtdSer – Fosfatidilserina**
- 42. ROI – Radical Intermediário de Oxigênio**
- 43. SC –Soro Crônico**
- 44. SI – Soro Imune**
- 45. Smac/ diablo – Proteína mitocondrial que potencializa a apoptose**
- 46. SN - Soro Normal**
- 47. SR-A – Scavenger Receptor - A**
- 48. SR- B - Scavenger Receptor - B**
- 49. TGF- $\beta$  - Transforming Growth Factor -  $\beta$**
- 50. TLR/ TOLL – Toll-like Receptors**
- 51. TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$**
- 52. TRADD – TNF Receptor 1 Associated Death Domain**
- 53. UV – Ultravioleta**
- 54. VnR – Receptor de Vitronectina**
- 55.  $\beta_2$ GPI -  $\beta_2$ Glicoproteína**

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>v</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Apoptose:</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Eliminação das células apoptóticas:</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Apoptose e Autoimunidade:</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Doença de Chagas:</b>	<b>20</b>
<b>1.5 Doença de Chagas e Autoimunidade:</b>	<b>21</b>
<b>1.6. Apoptose e Doença de Chagas:</b>	<b>26</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>31</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Parasitas:</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Infecção dos Animais:</b>	<b>33</b>
<b>4.3 Imunização dos Animais:</b>	<b>34</b>
<b>4.4 Reagentes e Soluções:</b>	<b>34</b>
<b>4.5 Obtenção dos Soros:</b>	<b>36</b>
<b>4.5.1 Soro Crônico:</b>	<b>36</b>
<b>4.5.2 Soro Crônico Apoptótico:</b>	<b>36</b>
<b>4.5.3 Soro Normal:</b>	<b>37</b>
<b>4.5.4 Soro Imune:</b>	<b>37</b>
<b>4.6 Purificação de Imunoglobulinas do Soro Crônico Chagásico</b>	<b>37</b>
<b>4.6.1 Imunoglobulina G</b>	<b>37</b>
<b>4.6.2 Imunoglobulina M</b>	<b>38</b>

<b>4.6.3 Fragmentos F(ab')<sub>2</sub> da IgG dos diferentes Soros</b>	<b>38</b>
<b>4.6.4 Fragmentos Fab do Anticorpo monoclonal 24G2 e isotipo controle</b>	<b>39</b>
<b>4.7 Obtenção de macrófagos peritoneais</b>	<b>40</b>
<b>4.8 Obtenção de Linfócitos T esplênicos purificados</b>	<b>40</b>
<b>4.9.Obtenção de Células Apoptóticas</b>	<b>41</b>
<b>4.9.1 Pelo calor</b>	<b>41</b>
<b>4.9.2 Por Irradiação</b>	<b>42</b>
<b>4.10 Tratamento das células apoptóticas</b>	<b>42</b>
<b>4.10.1 Com os diferentes soros</b>	<b>42</b>
<b>4.10.2 Com as Imunoglobulinas purificadas</b>	<b>42</b>
<b>4.11 Obtenção do Extrato de Baço Apoptótico</b>	<b>43</b>
<b>4.12 Co-cultura de macrófagos e Células apoptóticas</b>	<b>43</b>
<b>4.13 Dosagem de Citocinas</b>	<b>44</b>
<b>4.14 Análise por Western Blott</b>	<b>46</b>
<b>4.15 Citometria de Fluxo</b>	<b>46</b>
<b>4.16 Imunofluorescência</b>	<b>47</b>
<b>4.17 Ensaio de Fagocitose</b>	<b>47</b>
<b>4.18 Análises e Estatística</b>	<b>48</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>66</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>77</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Apoptose:

A apoptose ou morte celular programada é um fenômeno fisiológica essencial para o desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares (PASCAL *et al*, 2000). Ela representa um processo dependente de energia, e finamente regulado, que ocorre tanto em tecidos normais como em patológicos. É um processo crítico para remodelagem tecidual, regulação da resposta imune ou resolução da inflamação. (REINHARD *et al*, 1997; GREENBERG *et al*,2006). A apoptose pode ser iniciada por vários sinais externos ou internos e executada através de várias vias de sinalização interrelacionadas

A apoptose é caracterizada por uma seqüência de alterações morfológicas e bioquímicas, tais como condensação da cromatina nuclear, perda de volume celular, modificações estruturais e funcionais na membrana plasmática, degradação do citoesqueleto, culminando na fragmentação celular em corpos apoptóticos (vesículas contendo restos celulares). A nível molecular a maquinaria de morte forma uma complexa cascata de eventos ordenados que são controlados pela expressão regulada de genes e proteínas associadas a apoptose (KERR *et al*,1972). No que se refere aos complexos mecanismos bioquímicos que regulam o processo de morte celular por apoptose, nos últimos anos, vários trabalhos ajudaram a elucidar alguns destes mecanismos. Moléculas como proteases, quinases, moléculas adaptadoras, fatores de transição, entre outros, estão envolvidos neste processo. A maioria dos componentes da maquinaria de indução e/ou inibição da apoptose é produzido



constitutivamente em suas formas inativas e ativam-se ou são rapidamente ativadas quando o processo apoptótico tem início (revisto por AMARANTE-MENDES & GREEN, 1999).

Muitos estudos têm indicado que o componente central da maquinaria implicada na indução da apoptose é constituído por um conjunto de cisteínas proteases denominadas caspases por sua capacidade de reconhecer e clivar seletivamente após resíduos de ácido aspártico (MARTIN & GREEN, 1995; COHEN, 1997). As Caspases são expressas como pró-enzimas inativas (zimógenos) em células vivas e tornam-se ativas por processamento proteolítico quando as células recebem um sinal indutor de apoptose (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997; HENGARTNER, M.O., 2000; PHILCHENKOV, A., 2004).

Baseada na sua função pro-apoptótica as caspases têm sido divididas em dois grupos: Iniciadoras (caspases-2, -8, -9, -10 e provavelmente -11) e efetoras (caspases -3, -6 e -7) que são ativadas pelo primeiro grupo. (revisto por JOHNSON, D. E., 2000). As caspases efetoras são capazes de degradar diretamente múltiplos substratos incluindo proteínas estruturais e regulatórias no núcleo, citoplasma e citoesqueleto celular.

As caspases são conhecidas por clivarem numerosas proteínas celulares específicas, incluindo proteínas estruturais e regulatórias cuja degradação leva a mudanças morfológicas que caracterizam a morte celular por apoptose (SLEE *et al*, 1999). Como exemplo podemos citar a clivagem da lâmina nuclear, uma estrutura rígida formada por polímeros de laminina, importante para sustentação da membrana nuclear e que está implicada na organização da cromatina. Durante o processo apoptótico, a laminina é clivada por caspases, levando ao colapso da lâmina nuclear e contribuindo para a condensação da cromatina nuclear (TAKAHASHI *et al*, 1996; BUENDIA *et al*, 1999). As caspases também participam, indiretamente, da reorganização da estrutura do citoesqueleto, degradando proteínas tais como gelsolina levando ao “blebbing” da membrana (KOTHAKOTA *et al*,

1997). Uma das funções mais importantes das caspases é a de promover a clivagem do complexo inativo ICAD (que está no citoplasma), liberando o CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease) que promove a fragmentação do DNA (NAGATA, S. 2000).

Duas vias de ativação de caspases durante a apoptose tem sido descrita: a primeira via envolve a apoptose mediada por receptores de morte como Fas ou receptores TNF (NAGATA, S. 1997). Ao menos oito membros da família de receptores de morte tem sido identificado em humanos: TNF-R1, Fas (Apo-1, CD95), DR-3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDA-R (“Ectodermal dysplasia receptor”) e NGF-R (FRENCH, L.E. & TSCHOPP, J., 2003). Todos os receptores indutores de morte possuem o domínio de morte DD em suas teias citoplasmáticas, que consiste numa conservada região de cerca de 80 aminoácidos. Essa estrutura é crítica para o engajamento de moléculas da cascata apoptótica.

Em adição aos receptores de morte da família TNF, estudos recentes sugerem que outros antígenos da superfície celular possam estar envolvidos na sinalização apoptótica do Sistema Imune. Novos dados sobre a família de Imunoglobulinas implicam o membro CD47 com um papel funcional na regulação do crescimento de linfócitos e sugere que esse antígeno medeia morte celular pela ativação de uma forma de apoptose não clássica independente de caspases. (PETTERSEN, 2000).

A molécula Fas é um membro bem caracterizado da família de receptores de morte. O Fas ligante ao se ligar ao Fas inicia a trimerização do receptor, permitindo o recrutamento da molécula adaptadora FADD/Mort1 (para Fas-associated death domain protein) (BOLDIN *et al*, 1995; CHIMNAIYAN *et al*, 1996; HENGARTNER, 2000; KRAMMER, 2000), seguindo a ligação e autoativação da pro-caspase-8 ocorre a formação do complexo multiprotéico DISC (“Death Inducing Signaling Complex”), que é essencial para a iniciação da cascata apoptótica

(BOLDIN *et al*, 1996; YANG *et al*, 1998; HENGARTNER, M.O., 2000). Após a ativação da caspase-8 inicia-se a indução da cascata de caspases, a ativação das caspases executa o processo de apoptose por clivarem vários substratos intracelulares, levando a fragmentação do DNA genômico, formação do “blebbing” de membrana, e a exposição de moléculas sinalizadoras de fagocitose na superfície da célula. (STENNICKE *et al*, 1998; SHARMA, *et al*. 2000). A ativação da caspase-8 pode ser bloqueada pelo recrutamento do homólogo cFLIP (HENGARTNER, M.O., 2000). No que se refere ao TNFR1, este, via seu domínio de morte se liga ao TRADD (TNF Receptor 1-associated death domain) que é um mediador da interação do TNFR1 com o FADD (CHINNAYAN *et al.*, 1996).

Alternativamente a cascata de caspases pode ser iniciada de uma forma independente de receptores, por uma variedade de estímulos, incluindo agentes quimioterápicos.

Sinais pro-apoptóticos podem ser originados no núcleo, bem como em várias outras organelas celulares como a mitocôndria, retículo endoplasmático (ER), lisossoma e o complexo de Golgi (FERRI, K. F & KROEMER, G., 2001). Muitos estímulos apoptóticos induzido por stress metabólico em organelas celulares convergem na via de morte mitocondrial. Nesta via é descrito um mecanismo complexo de ativação da caspase-9, onde diversos sinais pro-apoptóticos convergem a nível mitocondrial provocando a translocação do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, o efluxo do citocromo C é o evento chave na ativação da via intrínseca. Não está claro exatamente como o citocromo C atravessa a membrana mitocondrial, mas sabe-se que a família Bcl-2 está envolvida nesse processo (ADAMS & CORY, 1998; GROSS *et al*, 1999; ANTONSSON & MARTINO, 2000). Essa família de proteínas é o principal regulador desta via. A razão entre membros anti-apoptóticos e pró-apoptóticos determina a morte ou sobrevivência da célula (KROEMER, 2001; CORY *et*

*al.*, 2003). Além disso, estudos demonstraram que as caspases induzem a liberação do citocromo C da mitocôndria por ativar fatores citosólicos. (GREEN) e colaboradores mostraram que quando células Jurkat foram submetidas a apoptose via receptor Fas o citocromo C foi liberado da mitocôndria, um evento que foi prevenido pelo inibidor de caspase ZVAD-fmk (WETZEL & GREEN, 1999). Uma vez no citoplasma, o citocromo C se liga ao Apaf-1 um cofator homólogo do CED-4 (proteína codificada pelo gene *ced-4*, requerido para regulação, execução e resolução da apoptose) (PASCAL *et al.*, 2000) em mamíferos que permite o recrutamento da pro-caspase-9. O Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1) foi identificado como uma das proteínas requeridas para ativação da caspase 9 (ZHOU *et al.*, 1997). O complexo Apaf-1/caspase-9 é atualmente considerado a verdadeira forma ativa da caspase-9. A interação do citocromo C com a proteína adaptadora Apaf-1 e com a pro-caspase-9 leva a ativação da caspase-9 e indução do sinal de morte (ZHOU *et al.*, 1999; CAIN *et al.*, 2000).

Na via mitocondrial, o complexo formado pelo citocromo C, Apaf-1 e caspase-9 é conhecido como apoptossoma que é um ativador da caspase efetora (CAIN *et al.*, 1999). AIF (Apoptosis Inducing Factor) inicia a apoptose pela ativação da Caspase-3 (SUSIN *et al.*, 1999).

As vias de receptores de morte e mitocondrial convergem na ativação da caspase-3 que é antagonizada pela proteína IAP (para Inhibitor of Apoptosis Proteins), que por sua vez são antagonizadas pelo smac/diablo e Omi/HtrA2 (proteína liberada da mitocôndria. (VERHAGEN *et al.*, 2000; SAELENS, *et al.*, 2004). O aumento na expressão de smac ou Omi/HtrA2 em células eleva sua sensibilidade para a indução de apoptose por radiação ultravioleta (MARTINS L.M., *et al.*, 2002; JIA, L., *et al.*, 2003). Após a ativação da caspase-3 o programa apoptótico culmina na eliminação da célula. A integração entre a via de receptores de morte e a mitocondrial é promovida pelo Bid, um membro pro-apoptótico da família Bcl-2.

A caspase-8 medeia a clivagem do Bid aumentando sua atividade pro-morte resultando na sua translocação para a mitocôndria, onde ele promove a saída do citocromo C (HENGARTNER, M.O., 2000).

Embora muitas das proteínas apoptóticas chaves tenham sido identificadas, os mecanismos moleculares de ação ou ativação das mesmas ainda permanecem obscuros sob alguns aspectos. A morte celular programada ou apoptose continuará sendo um campo de interesse para pesquisas futuras.

### **1.2 Eliminação das células apoptóticas: natureza dos receptores, reconhecimento, e conseqüências funcionais.**

O reconhecimento e captura de células apoptóticas é o evento final no programa de deleção celular (BOTTO *et al*, 2000). As células apoptóticas expressam alterações na superfície celular que são reconhecidas por receptores de fagócitos que detectam cada mudança na superfície e medeiam à interiorização dessas células (FADOK *et al*, 2000).

A remoção ocorre antes da lise, o que previne a liberação de conteúdos intracelulares tóxicos e imunogênicos das células apoptóticas para o tecido (FADOK *et al*, 1998a).

Através da indução e liberação de mediadores como TGF- $\beta$ , IL-10, Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) além de outros, a eliminação de células apoptóticas não é capaz de iniciar uma resposta imune (HENSON *et al*, 2001; FADOK & CHIMINI, 2001). Assim a fagocitose de células apoptóticas não é meramente um processo silencioso para a inflamação e imunidade, mas sim um processo antiinflamatório ativo (FADOK & CHIMINI, 2001).

Os mecanismos pelos quais as células apoptóticas podem ser reconhecidas e removidas têm sido objeto de grande interesse nos últimos anos. Vários receptores envolvidos no reconhecimento das células apoptóticas foram identificados e caracterizados. A eliminação das células apoptóticas é um processo complexo que envolve, não apenas um receptor, mas várias moléculas receptoras presentes nos fagócitos que cooperam para a completa ingestão.

Existem alterações já bem caracterizadas na superfície da célula apoptótica como a exposição da fosfatidilserina (PtdSer), que ocorre devido à perda da assimetria dos fosfolípidios da membrana plasmática (FADOK *et al*, 1992), ou ainda mudanças nos açúcares de superfície que são detectados por lectinas (atividade “lectin-like”) nos fagócitos (SAVILL & FADOK 2000). Já outros sinais são menos definidos, como os sítios que ligam moléculas presentes nos fluídos extracelulares, incluindo o C1q o primeiro componente do complemento, cujo papel tem sido confirmado em estudos demonstrando a eliminação deficiente de células apoptóticas em camundongos mutantes com falta da molécula C1q (SAVILL & FADOK 2000; BOTTO, M. & WALPORT, 2002). O papel de outros componentes da cascata do complemento iC3b, da proteína  $\beta_2$  glicoproteína I ( $\beta_2$ GPI) e da trombospondina ainda precisam ser mais esclarecidos. Também o receptor de vitronectina ( $\alpha V\beta 3$  integrina) que coopera com o CD36 na ligação da trombospondina na superfície das células apoptóticas atua no reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos (FREIRE-DE-LIMA, *et al.* 2000).

Muitos dos receptores de macrófagos que contribuem para o reconhecimento de células apoptóticas têm papel crítico na imunidade inata. Esses incluem certas lectinas e integrinas, receptores “scavenger” classe A e classe B (PLATT & GORDON, 2001; SAVILL *et al.*, 2002), receptores para LDL oxidado, incluindo CD68 e LOX-1 (Lectin-like Oxidized LDL

receptor-1), alguns dos receptores para complemento e o receptor de endotoxina CD14. (SAVILL & FADOK, 2000).

Esses receptores, quando participam da interiorização de microrganismos ou seus produtos, levam a ativação às células e conseqüente inflamação. Em contraste, a captura de células apoptóticas é geralmente não inflamatória evitando a ativação de uma resposta imune adquirida (FADOK & CHIMIM,G, 2001; SAVILL, 2002).

### ***Natureza dos receptores:***

Como mencionado anteriormente, durante a apoptose, ocorre uma série de mudanças na superfície da célula, a mudança melhor caracterizada associada com a apoptose é a perda da assimetria dos fosfolipídios e exposição da fosfatidilserina (FADOK *et al*, 2001), sendo esta mudança necessária para que haja o reconhecimento e posterior interiorização da célula apoptótica (FADOK *et al*, 2000; SAVILL, 2002).

O mecanismo de exposição da fosfatidilserina ainda não é bem entendido a nível molecular. Parece que esse mecanismo requer a ativação de um fosfolipídio apresentador que aumenta o “flip-flop” bidirecional através da membrana (SIMS & WIEDMER, 2001), e também a inativação de um aminofosfolipídeo translocase que normalmente levaria a fosfatidilserina para o lado interno da membrana (BEVERS *et al*, 1999). Quando a apoptose é induzida, a atividade da aminofosfolipídeo translocase é negativamente regulada, em parte devido à elevação dos níveis de cálcio intracelular (BRATTON, D.L. 1997). Além disso, a oxidação da fosfatidilserina durante a apoptose pode alterar sua habilidade para atuar como substrato da aminofosfolipídeo translocase, e conseqüentemente sua translocação para a parte interna da membrana (KAGAN, 2000 E TYURINA, 2000), o que acarreta na diminuição

significativa do transporte da fosfatidilserina de fora para dentro da membrana (FADOK, *et al.* 2001).

Em adição, a atividade do transportador ABC1, que ajuda a transferir colesterol e fosfolipídios das células para proteínas aceptoras como a apoA1, parece facilitar a exposição da fosfatidilserina (FADOK *et al.*, 2001; SAVILL *et al.*, 2002). A deleção do gene transportador ou a regulação negativa de seu produto reduz a exposição da fosfatidilserina durante a ativação e apoptose celular (HAMON *et al.* 2000). Também tem sido documentado que o aumento na interiorização de células apoptóticas por macrófagos expressando ABC1 pode resultar na perda da assimetria dos fosfolipídios de membrana nos macrófagos e nas células alvos (WU & HORVITZ, 1998). Em camundongos foi visto um papel importante para o ABC1 em fagócitos como os macrófagos, já que animais “knock-out” mostraram defeitos na captura de células apoptóticas (HAMON *et al.* 2000). O ABC1 é encontrado em macrófagos fagocitando células apoptóticas durante o desenvolvimento. A inibição desse transportador em macrófagos diminui dramaticamente sua capacidade de capturar células apoptóticas *in vitro e in vivo* (PASCAL *et al.* 2000). No entanto, a verdadeira relação do ABC1 como receptor de reconhecimento na apoptose ainda não está clara. O problema é que vários tipos celulares são capazes de capturar células apoptóticas, provavelmente uma função primitiva, e o ABC1 possui uma distribuição restrita a certos tipos celulares (HENSON, *et al.* 2001).

Um ponto interessante na captura de células apoptóticas se concentra na questão de se no sitio de inflamação a remoção dessas células é mediada por opsonização local. Foi mostrado que macrófagos ativados secretam MFG-E8 (Protein Milk- Fat Globule Epidermal Growth Factor-8) que possui uma seqüência integrina de reconhecimento, o MFG-E8 se liga seletivamente aos aminofosfolipídios expostos em células apoptóticas e aumentam a captura dessas células através do receptor  $\alpha_v \beta_3$  integrina expresso na superfície de macrófagos



(HANAYAMA *et al.*, 2002). Outras alterações de superfície tem sido implicadas na remoção de células apoptóticas, como por exemplo; 1) as alterações em carboidratos de membrana que são reconhecidas por fagócitos (DINI *et al.*, 1992); 2) a perda da assimetria dos fosfolipídios da membrana plasmática; 3) mudanças em açúcares de superfície detectados por lectinas (atividade “lectin-like”) nos fagócitos (SAVILL & FADOK 2000); 4) a presença do primeiro componente do complemento C1q e, outros componentes da cascata do complemento iC3b; 5) a proteína  $\beta_2$  glicoproteína I ( $\beta_2$ GPI) e trombospondina; 6) o receptor de Vitronectina ( $\alpha V\beta 3$  integrina) que coopera com o CD36 na ligação da trombospondina na superfície das células apoptóticas, dentre muitos outros, são implicados no reconhecimento da célula apoptótica pelo fagócito, pois são capazes de ligarem-se na superfície de células apoptóticas aumentando assim sua captura (FADOK, *et al.* 2001; revisto por EZEKOWITZ, 2002).

As células apoptóticas são capazes de fixarem diretamente o complemento, o que aumenta a eficiência da captura por macrófagos (MEVORACH, *et al.* 1998b). A exposição da fosfatidilserina em células apoptóticas está associada com a deposição de complemento (C3b) na superfície de células apoptóticas (FISHELSON *et al.* 2001; QUATIER *et al.*, 2005), já que somente células expondo a fosfatidilserina têm fragmentos C3 (principalmente C3b) na sua superfície (MEVORACH *et al.* 1998b; EZEKOWITZ, 2002).

Uma outra classe de receptores presentes em fagócitos, que também ajuda na captura de células apoptóticas são os “Scavenger receptors”, que são glicoproteínas capazes de endocitar lipoproteínas modificadas (PLATT & GORDON, 1999; SAVILL, 2002). Sabendo-se que os fosfolipídios de membrana tornam-se não somente redistribuídos, mas também oxidados durante o processo de apoptose (KAGAN, 2000), e que a oxidação dos fosfolipídios de membrana resultam no desenvolvimento de um ligante em macrófagos que pode ser inibido

por anticorpos monoclonais, que reconhecem formas oxidadas de fosfolipídios (CHANG, 1999), foi sugerido que esse receptor formado seja um dos “scavenger receptors”.

O receptor de fosfatidilserina no fagócito interage diretamente com a fosfatidilserina na célula apoptótica. Outras classes de proteínas ligantes para a fosfatidilserina incluem os “Scavengers receptors”, que são capazes de reconhecer formas oxidadas de lipoproteínas (PLATT & GORDON, 1999).

O GAS6 é uma proteína solúvel que pode reconhecer e ligar-se à fosfatidilserina nas células apoptóticas, e sua habilidade para participar da captura requereria um receptor no fagócito (ISHIMOTO, *et al.* 2000). Um candidato em potencial seria a molécula Mer, um membro da família de receptores tirosina quinases Axl, Mer, Tyro3, que é conhecido por ligar-se ao produto do gene GAS6. Recentemente, Scott e colaboradores mostraram que Mer pode ter um papel importante, já que camundongos transgênicos que expressavam um Mer defeituoso tiveram um defeito marcante na remoção de timócitos apoptóticos e desenvolveram uma doença autoimune semelhante ao Lupus Eritematoso Sistêmico (SCOTT *et al.* 2001). No entanto, ainda não é sabido se Mer atua via GAS6 e fosfatidilserina exposta *in vivo*.

Já foi relatado que o primeiro componente do complemento C1q é capaz de se ligar aos “blebs” de queratinócitos apoptóticos (KORB & AHEARN, 1997) e se localizam em outros tipos celulares apoptóticos (FISHELSON *et al.* 2001). Essas moléculas foram identificadas porque aumentam a captura de células apoptóticas por macrófagos *in vivo* (BOTTO *et al.* 1998; TAYLOR *et al.* 2000).

Por outro lado, tem sido sugerido que os “scavenger receptors” reconhecem células apoptóticas, particularmente SR-A e CD36 ou SR-B1 (PLATT & GORDON, 1999; PLATT &

GORDON, 2001). Envolvidos com a atividade CD36 estão o  $\alpha_v$  integrinas:  $\alpha_v\beta_3$  em macrófagos (Savill *et al.* 1992) e  $\alpha_v\beta_5$  em células dendríticas (ALBERT *et al.* 1998).

Outras moléculas importantes que são expressas em macrófagos e estão envolvidas na eliminação de células apoptóticas são o CD14, um receptor específico para fosfatidilserina e mais recentemente MGF-E8 (EZEKOWITZ, 2002).

A molécula CD14 é uma candidata para o reconhecimento de células apoptóticas, pois está envolvida na interação de lipopolissacarídeos com “Toll-Like” receptor 4, que tem sido implicado no reconhecimento de linfócitos apoptóticos. Em células apoptóticas a molécula ICAM3, que é regulada positivamente em linfócitos apoptóticos, pode ser um outro ligante (HENSON *et al.* 2001). O MFG8 que é secretado por macrófagos ativados é capaz de se ligar à superfície das células apoptóticas e favorecer seu reconhecimento através do receptor  $\alpha_v\beta_3$  expresso em macrófagos (EZEKOWITZ, 2002). Essas observações sugerem que outras interações específicas proteína-proteína podem estar envolvidas na remoção de células apoptóticas (SAVILL, 2002; LICHT *et al.*, 2004).

As células apoptóticas de mamíferos podem ser eliminadas pelo mecanismo mais convencional de fagocitose: a opsonização de células pela ligação de imunoglobulinas. Recentemente, foi sugerido que células apoptóticas iniciam o ataque do complemento C3bi seguido pela deposição de IgG, e subsequente captura via receptor 3 (CR3) (FISHELSON, *et al.* 2001; EZEKOWITZ, 2002; QUARTIER *et al.*, 2005). No entanto, as estruturas na célula apoptótica envolvida nessa opsonização ainda não foram definidas.

A IgM é capaz de se ligar na superfície de células apoptóticas (fosfolipídeos) e desencadear a ativação da cascata do complemento (C1q, C3bi), facilitando dessa forma, o reconhecimento e captura dessas células (GAIPL *et al.*, 2006).

### ***Conseqüências funcionais:***

A captura de células apoptóticas não induz liberação de mediadores inflamatórios e, aparentemente, a inflamação é ativamente suprimida, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, seguida da produção de mediadores antiinflamatórios como o TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e IL-10 (FADOK *et al*, 1998a; FREIRE DE LIMA *et al*, 2006 ).

Na ingestão de células apoptóticas por macrófagos *in vitro* observou-se a secreção de TGF- $\beta$ , o que resultou num efeito antiinflamatório e supressão da secreção de mediadores pró-inflamatórios (FADOK *et al*, 1998a). HUYNH e colaboradores (2002) demonstraram que a instilação direta de células apoptóticas *in vivo* aumentou a resolução da inflamação aguda, e que para isto, era necessária a presença da fosfatidilserina nas células apoptóticas e indução local de TGF- $\beta$ <sub>1</sub>. O efeito antiinflamatório era revertido por opsonização das células apoptóticas ou co-instilação de anticorpos neutralizantes de TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (HUYNH *et al*. 2002.). Estes dados propõem que o TGF- $\beta$  pode ser produzido em resposta ao reconhecimento de células apoptóticas, o que pode contribuir para a restauração da estrutura e função normal do organismo.

Os efeitos da fagocitose de células apoptóticas no próprio macrófago ainda não foram caracterizados completamente. MEAGHER e colaboradores (1992) estudaram inicialmente os efeitos de neutrófilos apoptóticos capturados por macrófagos derivados de monócitos, e não encontraram indução de N-acetilglucosaminidase ou Tromboxane  $\beta$ <sub>2</sub> (Tx- $\beta$ <sub>2</sub>). No entanto, se as mesmas células apoptóticas, fossem opsonizadas com anticorpo e fagocitadas por macrófagos, a indução dessas substâncias era detectada (MEAGHER *et al*. 1992).

Após a fagocitose de eosinófilos apoptóticos por macrófagos humanos a secreção de Tx- $\beta_2$  e GM-CSF não foi aumentada. Em contraste, a secreção dessas substâncias teve aumento após a ingestão de eosinófilos opsonizados ou necróticos (STERN *et al.* 1996).

Finalizando, FADOK e colaboradores (1998) demonstraram que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, e não de células apoptóticas opsonizadas com imunoglobulina, inibiu ativamente a produção de IL- $\beta_1$ , IL-8 e aumentou a produção de PGE<sub>2</sub>, PAF e TGF- $\beta$  (FADOK *et al.* 1998a).

Os dados mencionados acima sugerem que a fagocitose de células apoptóticas pelo mecanismo VnR/CD36 não leva a ativação dos macrófagos, enquanto a captura mediada pelo receptor FcR é estimulatória.

Uma vez que a captura de células apoptóticas por macrófagos desencadeia uma resposta antiinflamatória com liberação de mediadores como TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e IL-10 (Fadok *et al.* 1998a), este processo pode representar um mecanismo de escape e sobrevivência para alguns parasitas intracelulares. FREIRE-DE-LIMA e colaboradores (2000) demonstraram que a interiorização das células apoptóticas aumenta a sobrevivência e o crescimento do *Trypanosoma cruzi* (agente causador da doença de Chagas) em macrófagos, e que esse efeito é dependente da produção de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (FREIRE-DE LIMA *et al.* 2000).

Similarmente, existem evidências de que a apoptose em células tumorais também pode ter, em geral, um efeito deletério para o hospedeiro, como consequência da supressão local da inflamação e imunidade. (MELCHER *et al.* 1998).

Uma outra situação onde a captura de células apoptóticas tem um papel importante é na cicatrização, pois células são produzidas em excesso e o processo de apoptose e eliminação celular parece ser essencial para sua resolução. Já foi demonstrada a habilidade de macrófagos

em induzir apoptose em alvos determinados, especialmente no contexto da reorganização tecidual ou após inflamação ou fibrose (DUFFIELD, *et al.* 2000), o que confirma a importância deste processo nesse contexto.

Apesar do grande avanço nas informações acerca da eliminação de células apoptóticas, a complexidade do processo é muito grande e ainda permanece obscura. Muitos pontos ainda precisam ser esclarecidos para o completo entendimento desse mecanismo.

### **1.3 Apoptose e Autoimunidade:**

A apoptose é a forma fisiológica de morte celular onde a razão de divisão celular é balanceada pela razão de morte celular em organismos multicelulares. A desregulação da apoptose está associada com a patogênese de muitas doenças como câncer, neurodegeneração, autoimunidade, doença cardíaca e outras (LORENZ, *et al.* 2000). Firmes evidências relacionam o processo de apoptose com a indução de doença autoimune. Análises genéticas indicam que a deficiência em proteínas do soro ou em receptores que medeiam à eliminação de células apoptóticas eleva o risco de autoimunidade (CLINE & RADIC, 2004).

A apoptose tem um papel importante na doença autoimune, pois antígenos de células apoptóticas têm sido amplamente reconhecidos como alvos de autoanticorpos num grande espectro de doenças autoimunes. As duas doenças melhores caracterizadas são lúpus eritematoso sistêmico (LES) (CASCIOLA-ROSEN *et al.*, 1994; CASCIOLA-ROSEN *et al.* 1995; CASCIOLA-ROSEN *et al.* 1996) e a síndrome antifosfolípido (LEVINE *et al.*, 1999). Além disso, antígenos apoptóticos também foram implicados como autoantígenos na granulomatose de Wegener, poliartrite (GILLIGAN *et al.* 1996), e síndrome de Sjogren (TAPINOS, *et al.* 1999).

Autoanticorpos para vários autoantígenos, incluindo DNA são fatores comuns no LES e, os autoanticorpos anti-DNA, são os maiores fatores implicados na patogênese da doença. (KOTZIN, 1996).

O LES autoimune pode estar relacionado com a desregulação da morte celular por apoptose (HERKEL, *et al.* 2001). Em pacientes com LES, a fagocitose de células apoptóticas parece estar diminuída (HERMANN, *et al.*, 1998), e essa eliminação aberrante de células apoptóticas pode expor imunógenos antes inacessíveis para o sistema imunológico. (CASCIOLA-ROSEN, 1994).

Estudos mostraram que a opsonização pelo complemento é requerida para uma eficiente fagocitose de células mortas *in vitro* e que a captura dessas células opsonizadas está associada com a expressão de citocinas antiinflamatórias (MEVORACH, D. *et al.* 1998b).

A deficiência de componentes da via clássica do complemento, como o C1q e C<sub>4</sub> em humanos, são fatores de predisposição genética para o desenvolvimento do LES (MORGAN & WALPORT, 1991; CLINE & RADIC, 2004). Ademais, camundongos deficientes de C1q desenvolvem uma doença semelhante ao LES, caracterizada por autoanticorpos antinucleares e glomerulonefrite proliferativa. (BOTTO *et al.*, 1998).

Experimentos feitos com camundongos demonstraram um papel importante para o componente C1q na captura de células apoptóticas por macrófagos *in vivo*. Esse componente se liga especificamente à superfície dos blebs de células apoptóticas.

A deficiência do C1q acarreta uma diminuição na eliminação de células apoptóticas, que são implicadas como uma das maiores fontes de autoantígenos no LES. (TAYLOR *et al.*, 2000; MEVORACH, 2000).

Dessa forma, podemos inferir que a deficiência do C1q, uma condição comum no LES, está relacionada a um déficit na eliminação de células apoptóticas e pode ajudar no desenvolvimento da doença.

Uma outra opsonina também importante na eliminação de células apoptóticas é o anticorpo IgM, que em indivíduos normais são quantitativamente mais importantes para a ligação do C1q e ativação do C3b/bi na superfície de células apoptóticas, além disso, esses anticorpos naturais são capazes de se ligar a lisofosforilcolina que é exposta em células apoptóticas, facilitando sua eliminação (KIM S.J, *et al*, 2002; HART *et al.*, 2004).

Durante a apoptose, a membrana celular forma “blebs” citoplasmáticos, alguns dos quais formam os corpos apoptóticos. CASCIOLA-ROSEN e colegas (1996) mostraram que a apoptose de queratinócitos induzida por radiação ultravioleta (UV) leva a redistribuição de vários autoantígenos para os “blebs” apoptóticos. Além disso, a exposição sistêmica de células apoptóticas em camundongos induz a formação de autoanticorpos, indicando que a exposição sistêmica a células apoptóticas pode induzir uma resposta imune em camundongos normais (MEVORACH *et al.* 1998a).

A imunização de camundongos normais com células apoptóticas também resultou na formação de anticorpos contra autoantígenos complexos (LEVINE *et al.* 2006). Esses achados podem ajudar a explicar a seleção de antígenos e inicialização da resposta imune nas doenças caracterizadas pelo aumento da razão de apoptose como AIDS e, possivelmente o LES (MEVORACH *et al.* 1998a).

O LES é uma doença autoimune na qual a resposta de autoanticorpos possui uma variedade de autoantígenos alvos de localizações subcelulares diversas. CASCIOLA ROSEN e colegas (1994) demonstraram que esses autoantígenos estão presentes em duas populações distintas de “blebs” na superfície de células apoptóticas. A população de pequenos “blebs” é



composta de retículo endoplasmático fragmentado e ribossomos, bem como a ribonucleoproteína Ro. Os grandes “blebs” (corpos apoptóticos) possuem DNA nucleossomal, Ro, La e pequenas ribonucleoproteínas nucleares. Essas duas populações de estruturas de superfície celular nas células apoptóticas levam a noção de que os “blebs” de células apoptóticas são importantes partículas imunogênicas no Lupus (CASCIOLA-ROSEN, *et al.* 1994; CLINE & RADIC, 2004).

Também tem sido proposto que a fosfatidilserina exposta para o exterior dos “blebs” pode também induzir a produção de anticorpos antifosfolípidios, sugerindo a imunogenicidade desses “blebs” (CASCIOLA-ROSEN, 1995; LEVINE *et al.* 1999; LORENZ *et al.*, 2000).

Antígenos nucleares são gerados e liberados durante a apoptose. Uma característica da apoptose é a clivagem da cromatina por caspases; a desregulação da fragmentação do DNA pode ser diretamente ligada a indução de autoimunidade no LES (GABLER *et al.*, 2003). Células apoptóticas liberam grandes quantidades de oligonucleossomos (DNA-histona) e pacientes com lupus têm altas concentrações de células apoptóticas e de nucleossomos circulantes. (KOUTOUZOV & BACH. 1997; GABLER *et al.*, 2003). Adicionalmente, pacientes e camundongos com lupus possuem altos títulos de autoanticorpos antinucleossomos, anti-DNA e anti-histona. (HERKEL, *et al.* 2001).

Um fator comum em doenças autoimunes como o LES é a diminuição da tolerância a antígenos próprios e em consequência ocorre a produção de autoanticorpos reativos com múltiplas proteínas próprias (EGUCHI K. 2001). Alguns trabalhos evidenciaram que modificações de autoantígenos durante a apoptose levam ao desenvolvimento de autoanticorpos que ultrapassam os mecanismos normais de tolerância (MANCINI, *et al.* 1998; CASCIOLA-ROSEN, *et al.* 1999; LEVINE & KOH, 1999).

Com base nos dados acima pode ser proposto que um dos primeiros eventos que ocorrem no lupus é uma tendência aumentada para a apoptose de determinadas populações celulares (provavelmente células linfóides que mostram uma razão de replicação anormal nesta doença) (KOUTOUZOV, *et al.* 1996) o que levaria a expressão aumentada ou aberrante de alguns constituintes celulares que se tornariam anormalmente imunogênicos (CASCIOLA-ROSEN, *et al.* 1996; PITTONI & VALESINI, 2002).

A captura de nucleossomos por receptores de nucleossomos levaria a formação de anticorpos direcionados contra os nucleossomos, DNA e histonas (KOUTOUZOV, *et al.* 1996, HERKEL *et al.* 2001). Foram acumuladas evidências sugerindo que diferentes populações de autoanticorpos são responsáveis pelas várias manifestações clínicas de doenças autoimunes (CLINE & RADIC, 2004).

Esses dados sugerem que a apoptose pode estar implicada com a patogênese da autoimunidade, embora os mecanismos possam ser distintos em cada doença autoimune.

Um outro fator de predisposição para a autoimunidade seria a ocorrência de uma alteração na sensibilidade a apoptose induzida por receptores CD95. O CD95 é expresso em praticamente todos os tipos de células que podem ser alvos da resposta autoimune órgão específica.

A excessiva ou defectiva susceptibilidade a apoptose induzida por CD95 é um dos principais mecanismos patogênicos em uma variedade de doenças autoimune. As raras mutações do CD95 ou CD95L estão relacionadas com várias doenças linfoproliferativas em humanos e em camundongos, demonstrando o importante papel dessas moléculas no desenvolvimento de autoimunidade. (RAMENGGHI, *et al.* 2000).

Embora, esteja claro que a apoptose induzida por CD95 contribua para a destruição célula alvo em autoimunidade órgão específica, estudos futuros são necessários para encontrar

se mecanismos citotóxicos múltiplos podem contribuir para a destruição tecidual em um único indivíduo ou se uma única doença autoimune pode ser heterogênea e resultar de diferentes mecanismos patogênicos em indivíduos diferentes.

#### **1.4 Doença de Chagas:**

A doença de Chagas é uma infecção parasitária crônica, que afeta cerca de 20 milhões de pessoas na América Latina (TARLETON & ZHANG, 1999). Esta doença é causada pelo *Trypanosoma cruzi* um protozoário flagelado, digenético que parasita alternadamente hospedeiros invertebrados (triatomíneo hematófago) e vertebrados (mamíferos, incluindo o homem).

O *T. cruzi* é um parasita intracelular obrigatório que infecta uma variedade de células do hospedeiro incluindo fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, neurônios, mas parece mostrar preferência por células do sistema fagocítico mononuclear e células musculares, principalmente músculo cardíaco e liso (BRENIERE *et al.*, 1989).

Nessa infecção o indivíduo desenvolve uma doença associada com a destruição inflamatória do tecido cardíaco ou trato digestivo, o que é uma característica de infecções que resultam no ataque imunológico de tecidos hospedeiros.

O estudo da doença de Chagas é caracterizado pelo uso de modelos animais, que reproduzem diferentes aspectos da doença humana. Camundongos infectados pelo *T. cruzi* podem desenvolver muitos dos distúrbios imunológicos presentes em humanos infectados, fazendo do modelo murino um dos mais utilizados para o estudo da interação *T. cruzi* sistema imune (ANDRADE, *et al.* 1991).

### **1.5 Doença de Chagas e Autoimunidade:**

A destruição do tecido cardíaco e nervoso do hospedeiro na doença de Chagas pode estar relacionada com dois mecanismos não exclusivos: 1) Resposta autoimune: a infecção pelo *T. cruzi* induz uma resposta imune que tem como alvo os próprios tecidos do hospedeiro e independe da persistência do parasita (KIERSZENBAUM, 1999; LEON & ENGMAN, 2001); e 2) Persistência do parasita: a persistência do parasita em sítios específicos no hospedeiro resulta na reatividade inflamatória e destrutiva crônica. (TARLETON, 2001).

#### ***Hipótese da autoimunidade:***

A escassez de parasitas na fase crônica da doença, a existência de uma fase assintomática entre a aguda e a crônica, a ocorrência de reações autoimunes contra componentes de nervos e músculos (PETRY *et al*, 1991), a transferência de lesões inflamatórias com linfócitos (DOS SANTOS *et al*, 1992) e a rejeição de enxertos cardíacos normais por animais cronicamente infectados (DOS SANTOS *et al*, 1992), têm sido tomados como evidências de um componente autoimune na etiologia da doença de Chagas crônica. Embora existam argumentos a favor de que algumas dessas reações autoimunes sejam secundárias à destruição tissular causada pela infecção (LEVIN, 1996), outras sugerem o envolvimento de reações cruzadas entre antígenos próprios e do parasito na geração das lesões da doença de Chagas crônica (CUNHA NETO *et al*, 1996). Outro fator importante está relacionado com a ativação policlonal de linfócitos que levaria à perda da tolerância pelo hospedeiro, favorecendo a permanência crônica do parasito através da manutenção de um certo nível de imunodepressão (Revisto por SOARES, M.B. P *et al*, 2001).

Existem vários mecanismos que poderiam explicar a autoimunidade na infecção pelo *T. cruzi*. A maioria é baseada na observação de que um hospedeiro imunocompetente possui células T e B autoreativas circulantes que são normalmente tolerantes para antígenos próprios (DIGHIERO & ROSE, 1999). A infecção poderia contribuir com sinais de “perigo”, quebrando a tolerância ao próprio.

No mecanismo de ativação “bystander” existem dois componentes, que poderiam depender do ambiente inflamatório induzido pela infecção do *T. cruzi* no tecido hospedeiro (TALVANI *et al.* 2000). Uma hipótese seria que o ambiente proinflamatório no tecido hospedeiro, rico em citocinas, óxido nítrico e quimiocinas, seria suficiente para ativar células T autoreativas por reduzir o limiar de ativação (FEDOSEYEVA *et al.* 1999). Essas células proliferariam em resposta a antígenos próprios apresentados por APC (células apresentadoras de antígenos) do hospedeiro. O outro componente seria a citólise de miocardiócitos resultante da infecção chagásica, que levaria a liberação de proteínas do hospedeiro. Os elevados níveis de antígenos miocárdicos no ambiente proinflamatório levaria a uma apresentação aumentada de peptídeos próprios e estimularia a expansão de células T autoreativas (LEON & ENGMAN, 2001).

Um outro mecanismo proposto na hipótese da autoimunidade é o epítipo “críptico”, que sugere que células T do hospedeiro sejam central ou periféricamente tolerizadas para peptídeos normalmente processados e apresentados por APCs do hospedeiro. Na doença de Chagas a inflamação tecidual poderia originar novos epítipo crípticos que seriam apresentados por APC. Uma vez que, as células T circulantes não são tolerantes a esses novos epítipos, elas se tornariam ativadas e iniciariam a autoimunidade (YORK *et al.* 1999). Esta hipótese é que está de acordo com a idéia de que o processo de apoptose seja capaz de gerar epítipos novos (crípticos) pela ação de caspases e de radicais de O<sub>2</sub> sobre proteínas da célula.

O último mecanismo sugere a existência de uma reatividade cruzada entre o parasita e as proteínas do hospedeiro (mimetismo molecular). Refere-se à similaridade na seqüência de aminoácidos ou conformação estrutural entre moléculas ou segmentos de moléculas do *T. cruzi* e seu hospedeiro. Células T específicas com reatividade para proteínas do *T. cruzi*, também reagem cruzadamente com proteínas do hospedeiro, podendo dar início à reação autoimune (CUNHA NETO *et al*, 1996).

No entanto, não existem evidências diretas de que a reatividade cruzada de proteínas do parasita possa induzir autoimunidade.

A fagocitose e o processamento de células apoptóticas podem estar envolvidos na autoimunidade, já que existem evidências de que defeitos no processo de fagocitose levam ao desenvolvimento de doenças autoimunes. (BOTTO *et al*. 1998)

Concluindo, esses mecanismos não são exclusivos e também podem operar em série, ou seja, uma autoimunidade induzida via mimetismo molecular pode liberar proteínas do hospedeiro, gerando uma ativação “bystander” e uma resposta autoimune contra alvos adicionais.

### ***Persistência do parasita:***

A persistência do parasita é a causa primária da doença proporcionada pela infecção por *T. cruzi* (TALERTON & ZHANG, 1999). Existem evidências obtidas por resultados clínicos de que a doença de Chagas está relacionada com a persistência do parasita em sítios específicos. A associação órgão-específico do parasita foi documentada em vários trabalhos, onde a presença de parasitas no coração de pacientes chagásicos foi detectado apenas naqueles que apresentavam cardiopatia diagnosticada (JONES *et al*, 1992). De acordo com esse fato foi

encontrado no tecido do esôfago de paciente com megaesôfago ou lesão inflamatória nesse órgão DNA de *T. cruzi*, mas não em pacientes com cardiopatia sem sinais de megaesôfago (VAGO *et al*, 1996). Contudo, foi sugerido que a presença do parasita ou seus antígenos pode persistir por longos períodos nas lesões e isso seria um indicativo de uma infecção sítio-ativo.

Além dos trabalhos citados acima, outros estudos também sugerem que a presença do parasita é importante para a geração da miocardite da fase crônica. Corroborando estes resultados, foi encontrado DNA do parasita nas lesões inflamatórias do miocárdio de pacientes infectados (JONES *et al*, 1993), e a rejeição de corações normais transplantados ocorre apenas em modelos onde existe a presença de antígenos de *T. cruzi* no enxerto.

Além disso, o tratamento com diminuição da parasitemia resulta numa redução concomitante da severidade da doença, e o aumento no nível de parasitas acarreta no exacerbamento da doença (TALERTON, 2001). Sugerindo um papel importante da presença do parasita em relação à patogenicidade da infecção.

TARLETON & ZHANG (1999) documentaram que técnicas como o PCR, hibridização *in situ* e imunohistoquímica, foram capazes de revelar a presença do parasita em sítios da doença (TALERTON & ZHANG, 1999).

Dessa forma, pode-se concluir que a severidade da doença está diretamente relacionada com a presença do parasita no tecido afetado.

No entanto, análises de fragmentos de coração humano não mostraram correlação entre a intensidade da inflamação e o parasitismo, o que seria de se esperar se a persistência do parasita fosse o único fator dirigindo a resposta patológica.

Assim, ainda não está claro qual dos mecanismos explicaria a origem da patogênese da doença de Chagas, existem evidências favoráveis a ambas as teorias o que não exclui o papel de cada uma no desenvolvimento da doença.

***Hipótese do “Funeral Fagocítico”:***

Esta nova hipótese propõe um importante papel na presença do parasita para a indução da autoimunidade. A apoptose de miocardiócitos infectados, na presença de um ligante de TOLL no parasita, levaria a indução de células T autoreativas contra proteínas do *T. cruzi* e proteínas cardíacas.

A persistência do parasita no sítio inflamatório seria crucial para gerar a estimulação sustentada por TLR. Onde as células dendríticas fagocitariam os cardiomiócitos apoptóticos e receberiam um sinal de TOLL gerado pela ligação de moléculas do parasita ao TLR. (revisto por DOS REIS *et al*, 2005).

A eliminação de células apoptóticas um evento comumente anti-inflamatório pode também levar a liberação de citocinas pró-inflamatórias dependendo do ambiente. Isso ocorre quando células fagocíticas engajam simultaneamente a célula apoptótica e um ligante TLR, o que permite a secreção de citocinas como TNF- $\alpha$ . Assim, haveria o recrutamento e ativação da resposta inata, quando a morte celular ocorresse num sítio infectado ou inflamado.

Autoantígenos derivados de células apoptóticas são apresentados por fagócitos que na presença de “sinais de perigo” levam a maturação de células dendríticas e apresentação de autoantígenos para células T autoreativas gerando a autoimunidade.

Corroborando com esses dados, um estudo de ERIKSSON e colaboradores, mostrou que a estimulação de células dendríticas sustentada por TLR é requerida para a indução de miocardite autoimune, onde as células dendríticas tratadas com cardiomiócitos apoptóticos na presença de LPS, um ligante de TLR induz a doença autoimune. (ERIKSSON, *et al*, 2003).



Dessa forma, pode-se inferir que a apoptose de cardiomiócitos infectados na presença da sinalização por TLR levaria a autoimunidade.

### **1.6. Apoptose e Doença de Chagas:**

A apoptose é induzida no curso da resposta imunológica a agentes infecciosos. Na doença de Chagas tanto a resposta imune inata quanto a adquirida são importantes no processo de controle do parasita, mas apesar disso, o parasita persiste no tecido (TARLETON & ZHANG, 1999), o que pode ser devido à morte de células T por apoptose durante essa resposta na infecção aguda (LOPES, *et al.* 1999). Essa morte de linfócitos T foi demonstrada por LOPES e colaboradores (1995), na infecção aguda células T CD4<sup>+</sup> de camundongos infectados com *T. cruzi*, morriam por apoptose após estimulação *in vitro* (LOPES, *et al.* 1995). Nessa fase, também foram detectadas uma hiperexpressão da molécula Fas, e uma susceptibilidade aumentada para a morte de células T via Fas. A participação da molécula Fas foi confirmada pela utilização de camundongos *gld* (deficientes da molécula FasL). Células T CD4<sup>+</sup> de camundongos BALB *gld/gld*, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, quando cultivadas na presença de anticorpo anti-CD3 não sofriam morte induzida por ativação (AICD) (Lopes *et al.* 1999). A AICD mediada por Fas/Fas-L tem como alvo preferencial células Th1, o que sugere um papel importante na patogênese da doença de Chagas, já que essas células estão envolvidas na resistência ao *T. cruzi* (revisto por DOS REIS *et al.*, 2005).

Além disso, a apoptose de linfócitos dirige a produção de anticorpos. O fratricídio de células B mediado pela interação Fas-Fas-L na infecção pelo *T. cruzi* já foi demonstrado, e ocorre uma apoptose preferencial de células B que produzem IgG específica para o parasita. (ZUÑIGA, *et al.*, 2002)

A apoptose de linfócitos tem sido associada com mecanismo de escape do parasita na doença de Chagas. Já foi demonstrado que a fagocitose de células apoptóticas é um processo antiinflamatório, com produção de mediadores como TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e PAF (FADOK *et al.* 1998a), e que o TGF- $\beta$  aumenta a susceptibilidade à infecção do *T. cruzi* (DOS REIS *et al.* 2005). A diferenciação de macrófagos induzida por células apoptóticas é similar à ativação induzidas por citocinas Th2.

Recentemente, FREIRE-DE-LIMA e colaboradores (2000) verificaram que células apoptóticas, mas não necróticas ou vivas, eram capazes de desativar os macrófagos, bloqueando a produção de óxido nítrico e exacerbando a multiplicação do *T. cruzi*. (FREIRE-DE-LIMA *et al.* 2000)

A captura das células apoptóticas via VnR (receptor de vitronectina) gera uma intensa produção de PGE<sub>2</sub> e, subsequente, secreção de TGF- $\beta$ , acarretando o crescimento do parasita. Seguindo do engajamento do VnR e secreção autócrina de TGF- $\beta$ , as células apoptóticas induzem atividade ornitina descarboxilase (ODC) e síntese de poliaminas (principalmente putrescina) no macrófago. Por outro lado, o bloqueio da síntese de poliaminas inibe o crescimento do *T. cruzi* induzido pelas células apoptóticas (FREIRE-DE-LIMA *et al.* 2000). Além disso, experiências realizadas *in vivo* mostraram que a parasitemia está exacerbada em camundongos que receberam injeção de células apoptóticas. O bloqueio farmacológico da secreção de PGE<sub>2</sub> previniu a multiplicação do parasita *in vitro* e controlou a parasitemia *in vivo*. (FREIRE-DE-LIMA *et al.* 2000), sugerindo que o fenômeno é imunopatogênico na infecção por *T. cruzi*.

O conjunto desses dados sugere um papel crítico da apoptose de linfócitos na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

## 2. Justificativa

A doença de Chagas é uma infecção crônica causada pelo *Trypanosoma cruzi*, essa doença é altamente prevalente na América Latina.

No curso da doença de Chagas ocorre freqüente apoptose de linfócitos (revisto por DOS REIS *et al*, 2005). E essa apoptose direciona a produção de autoanticorpos na infecção.

A morte induzida por ativação (AICD-Activation-Induced Cell Death) é o principal mecanismo de tolerância periférica e regulação negativa da resposta imune. Previamente, foi demonstrado uma intensa apoptose de linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante a fase aguda da doença de Chagas experimental (LOPES *et al*, 1995). A AICD exacerba a replicação dos parasitas em co-cultura de macrófagos, e a via de morte mediada pela interação Fas/FasL tem efeito deletério (NUNES *et al*, 1998).

Existem evidências que relacionam a apoptose com a indução de autoimunidade. Antígenos de células apoptóticas são reconhecidos como alvos de autoanticorpos num grande número de doenças autoimunes (CASCIOLA-ROSEN *et al*, 1996).

Na infecção pelo *T. cruzi* a ocorrência da autoimunidade está associada com a produção de autoanticorpos. Onde uma das prováveis hipótese seria o aumento da apoptose no sitio de infecção. Essas células seriam fagocitadas e num ambiente inflamatório e infectado haveria a indução de células autoreativas e subsequente produção de autoanticorpos. (DOS REIS *et al*, 2005).

A imunização, com células apoptóticas, induz a produção de autoanticorpos (MEVORACH *et al*, 1998a). Em nosso estudo tentamos determinar a produção de autoanticorpos reativos contra células apoptóticas.

Os autoanticorpos contra células apoptóticas também podem exercer efeito proinflamatório (CHANG *et al*, 2004).

A fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz a produção de TGF- $\beta$ , mas não citocinas proinflamatórias. Contudo, a fagocitose de neutrófilos opsonizados pela IgG mediada pelo receptor Fc leva a secreção de citocinas proinflamatórias (FADOK *et al*, 1998a).

Com base nos dados acima e com a descrição do possível mecanismo envolvido no aumento da multiplicação dos parasitas relatado recentemente por FREIRE-DE-LIMA e colaboradores. Trabalho no qual foram descritos os efeitos supressores das células apoptóticas na atividade proinflamatória dos fagócitos que eram mediados pela secreção de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . A cascata de eventos que ocorre após o reconhecimento e captura das células apoptóticas por macrófagos e a sua relação com o aumento do crescimento do parasita, foi descrito. Os autores verificaram que a captura de células apoptóticas por macrófagos infectados pelo *T. cruzi* via receptor de vitronectina (VnR) tinha um efeito desativador no macrófago, permitindo um aumento na multiplicação dos parasitas intracelulares. Esse aumento era dependente da produção de TGF- $\beta$  (FREIRE-DE-LIMA *et al*. 2000).

Resolvemos avaliar o papel da opsonização das células T apoptóticas com os autoanticorpos produzidos no curso da doença de Chagas.

Questões importantes à cerca da apoptose e doença de Chagas ainda precisam ser esclarecidas: 1) Existe a formação de anticorpos contra células apoptóticas geradas na Doença de Chagas? 2) Qual a importância funcional desses anticorpos na interação dos fagócitos com *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro? 3) Existe um clone de células T contra constituintes próprios apresentados por células endocíticas que tenham ingerido células apoptóticas?

Com base nessas questões nós resolvemos avaliar o impacto das células apoptóticas e seus possíveis autoanticorpos na Doença de Chagas Experimental.

### **3. Objetivos**

#### **Objetivo Principal**

Investigar a presença de autoanticorpos contra células apoptóticas na infecção pelo *T. cruzi*, e avaliar seu papel na replicação do parasita

#### **Objetivos Específicos**

- 3.1.** Avaliar a presença de anticorpos anti-células apoptóticas no soro de camundongos na fase crônica da doença de Chagas, e suas implicações na patogênese da doença;
- 3.2.** Estudar as conseqüências funcionais da interação entre o *Trypanosoma cruzi* e macrófagos que tenham fagocitado células apoptóticas opsonizadas pelos soros obtidos de animais normais e cronicamente infectados;
- 3.3.** Estudar o impacto exercido pelos soros obtidos de animais crônicos ou normais sobre a produção de citocinas e o crescimento do *Trypanosoma cruzi* em co-culturas de monocamadas de macrófagos peritoneais, obtidas de animais normais, e células apoptóticas;
- 3.4.** Purificação de imunoglobulina do Soro Chagásico, e sua utilização em experimentos de opsonização e co-cultura com macrófago;

- 3.5.** Avaliar o efeito exercido pelos autoanticorpos obtidos do soro Chagásico sobre a fagocitose de macrófagos;
- 3.6.** Avaliar o papel do receptor Fc na ativação de macrófagos que ingeriram células apoptóticas opsonizadas com autoanticorpos do Soro Chagásico, e seu papel na patogênese da doença;

## 4. Metodologia

### 4.17. Parasitas:

Em todos os experimentos foi utilizado o clone Dm28c do *T. cruzi* (CONTRERAS et al, 1985).

Formas tripomastigotas foram obtidas por metaciclo gênese do clone Dm28c de *T. cruzi*. Os parasitas foram cultivados em meio BHI com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 7 dias de cultura os parasitas foram recolhidos e centrifugados por 10 minutos à 2500rpm. Após a contagem os parasitas foram ajustados para uma concentração de  $10^8$ / mL de meio TAU (Triatomine Artificial Urine) e incubados a 28°C por 2 horas. Depois as células foram transferidas para o meio TAU-P ( $5 \times 10^7$ ) em 10 mL de meio e incubadas por 120 horas 28°C.

### 4.17. Infecção dos animais:

Foram usados camundongos BALB/c (8-9 semanas) pesando 25-30g fornecidos pelo CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório) do Instituto Oswaldo Cruz.

Culturas axênicas de formas epimastigotas do clone Dm28c do *Trypanosoma cruzi* foram mantidas a 28°C em meio BHI suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL- Life Technologies).

Tripomastigotas metacíclicos foram obtidos a partir de cultura de formas epimastigotas na fase estacionária através de metaciclo gênese em meio TAU-P. As formas epimastigotas foram centrifugadas a 2200 rpm por 10 minutos a 15°C e o pellet ressuspensão em meio TAU-P.  $5 \times 10^7$



epimastigotas foram distribuídos em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) contendo 10 mL de TAU-P e incubadas a 28<sup>o</sup>C. Após 72-96 horas o número de tripomastigotas metacíclicos, presentes no sobrenadante, foi contado em câmara de Neubauer.

Camundongos Balb/c macho (6 a 8 semanas), foram infectados via intraperitoneal com tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* na concentração de 10<sup>5</sup> parasitas/ 0.1 mL.

#### **4.17. Imunização dos animais:**

Células esplênicas foram obtidas de camundongos BALB/c machos, ressuspensas em meio incompleto na concentração de 10<sup>7</sup> células/mL, num volume total de 10mL.

A suspensão de células foi submetida à irradiação (3000 rads) para indução de apoptose, e depois colocadas em cultura por 1 hora em estufa a 37<sup>o</sup>C e 7% de CO<sub>2</sub>.

Após a morte das células a suspensão foi centrifugada, ressuspensa num volume de 250 µl e misturadas ao Adjuvante Completo de Freund (Sigma Chemical Co.) na proporção de 1:1, a suspensão foi homogeneizada no sonicador.

Em seguida, 50µl da suspensão foi injetada no coxim plantar das patas traseiras dos animais (5 animais). Após 15 dias foi realizado um segundo desafio, onde foi injetado no peritônio dos animais 10<sup>7</sup> células/100µl. Uma semana depois, os animais foram sacrificados, em câmara de CO<sub>2</sub>, para obtenção do soro.

#### **4.4. Obtenção dos soros:**

##### **4.4.1. Soro Crônico:**

Animais Balb/c macho foram infectados com  $10^5$  tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*, após 3 meses de infecção, foram submetidos à punção cardíaca e retirado cerca de 1mL de sangue que foi posto na geladeira em eppendorf por 1 hora. O sangue obtido foi centrifugado e o soro recolhido e incubado a  $56^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para ser inativado

##### **4.4.2. Soro crônico apoptótico:**

Animais Balb/c machos infectados com  $10^5$  *T. cruzi*, após 3 meses de infecção foram injetados (via intra peritoneal) com  $10^7$  esplenócitos apoptóticos, obtidos de animais normais e induzidos a apoptose por calor. Após sete dias da injeção, esses animais foram submetidos à punção cardíaca, o sangue obtido foi centrifugado, o soro recolhido e inativado por 30 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ .

##### **4.4.3. Soro normal:**

Camundongos Balb/c machos (6 a 8 semanas) foram submetidos à punção cardíaca. O sangue obtido foi centrifugado e o soro recolhido foi inativado por 30 minutos a  $56^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.4. Soro imune:**

Camundongos Balb/c machos (6 a 8 semanas) após imunização com esplenócitos apoptóticos foram submetidos à punção cardíaca. O sangue obtido foi centrifugado e o soro recolhido e inativado por 30 minutos a 56°C.

#### **4.5. Purificação de Imunoglobulina do Soro Chagásico:**

##### **4.5.1. Imunoglobulina G:**

A solução de estocagem da coluna de Proteína A foi retirada, e a coluna equilibrada com 13 mL de Tris 10 mM pH 8.0. Depois, a amostra de soro (3 mL) diluída numa proporção de 1:1 em Tris 10 mM pH 8.0 foi aplicada e acrescentados 6 mL de Tris 10 mM pH 8.0, depois a coluna foi transferida para um tubo de ensaio.

Depois, a imunoglobulina G foi eluída com uma solução de glicina pH 3.0 (1mL) por 6 vezes seguidas. Após esse procedimento, acrescentou-se 100µl de Tris 1mM pH 7.5 a cada mL da amostra eluída. A amostra coletada foi concentrada com Amicon, que foram lavados com água destilada por 4 vezes. Depois, as amostras foram adicionadas e centrifugadas. A imunoglobulina foi coletada e a quantificação foi feita através de leitura no espectrofotômetro num  $\lambda = 280$ .

#### **4.5.2. Imunoglobulina M:**

A solução de estocagem foi retirada da coluna e pré-lavada com 5 ml de tampão, depois a coluna foi equilibrada com 20 ml de tampão. Após este procedimento aplicou-se a amostra de soro diluída 1:1 no tampão de diluição. Após a penetração da amostra no gel foram adicionados 0.5 ml do tampão e a coluna foi incubada por 30 minutos a 4 °C. Depois da incubação, a coluna foi lavada com 42 ml do tampão para remoção das proteínas que não se ligaram. Foram coletadas frações de 3ml e a suspensão foi monitorada por dosagem de proteínas.

Depois foram adicionados 3 ml de tampão e, a coluna foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Depois da incubação foi coletado o eluato em frações de 3ml usando o tampão de eluição. A eluição da IgM foi monitorada usando absorbância de 280 nm. Todas as frações com absorbância  $\geq 0.02$  foram postas no mesmo tubo. As frações de IgM foram dializadas.

Para avaliar a pureza das frações foram feitas análises por eletroforese e ELISA.

#### **4.5.3. Fragmentos F(ab')<sub>2</sub> da IgG dos diferentes soros:**

Primeiramente a Pepsina Imobilizada foi equilibrada através da adição de 0.25 ml de pepsina para um tubo teste. Depois foram adicionados 4 ml de tampão de digestão. A pepsina foi separada do tampão usando-se um tubo separador. Após descartar o tampão e repetir o procedimento de lavagem 2 vezes a pepsina imobilizada foi ressuspensa em 0.5 ml de tampão de digestão.

Adicionou-se 1 ml da amostra (0.5 ml de IgG + 0.5 ml de “tampão de digestão”) para o tubo contendo a pepsina imobilizada, depois a amostra foi incubada por 4 horas em banho Maria a 37°C com movimento rotatório de alta velocidade. Os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> solubilizados foram recuperados, os fragmentos Fc e a IgG não digerida. Colocou-se a solução digerida em tubo limpo.

A coluna de proteína A foi equilibrada com 12 ml de tampão e adicionados 3 ml da solução digerida. Depois da penetração total da amostra no gel a coluna foi lavada com 6 ml de tampão, e o eluato com os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> coletado. Depois foi feita a diálise em PBS pH7.4 por 18 horas em membrana de peso molecular 50.000 daltons para eliminar os pequenos fragmentos Fc.

A pureza das preparações foram analisadas por eletroforese.

#### **4.5.4. Fragmentos Fab do Anticorpo monoclonal 24G2 (Fc Block) e isotipo controle:**

A Papaína imobilizada foi Equilibrada colocando-se 0.5 ml de papaína num tubo teste e adicionando-se 4 ml do tampão de digestão. A Separação da papaína do tampão foi feita usando um tubo separador e o tampão descartado, esse procedimento foi repetido 2 vezes. A papaína foi ressuspensa em 0.5 ml do tampão de digestão.

Adicionou-se 1 ml da amostra para o tubo com papaína imobilizada, e incubou-se por 5 horas em banho Maria a 37°C com movimento rotatório de alta velocidade. Depois os fragmentos Fab e Fc solubilizado e IgG não digerida foram recuperados.

A coluna de proteína A foi equilibrada com 13 ml de tampão, e 3 ml da solução digerida foi aplicada e deixou-se penetrar no gel. A coluna foi lavada com 6 ml de tampão e coletado o eluato onde estariam os fragmentos Fab. A avaliação da pureza foi feita por eletroforese.

#### **4.6. Obtenção de macrófagos peritoneais:**

Células totais foram obtidas após lavagem da cavidade peritoneal com 5mL de solução de Hanks' a 37<sup>0</sup> C. Este lavado peritoneal foi centrifugado (1500rpm/10 min/ 4<sup>0</sup>C) e o número de células estimado pelo método de exclusão em azul de Trypan. Aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> células/mL foram mantidas por 2 horas em placas de 48 poços (Nunc). Em seguida os poços foram lavados com Hanks' para a remoção das células não aderentes e a monocamada de macrófagos peritoneais (aproximadamente 2.5 x 10<sup>5</sup>/ mL) foi cultivada sob diferentes condições.

#### **4.7. Obtenção de linfócitos T esplênicos purificados:**

Os baços foram retirados assepticamente e cuidadosamente macerados sobre tela de aço inox com a ajuda de um êmbolo de seringa e tratados com ACK, para eliminação das hemácias. Após sucessivas lavagens em Hanks' o número de células viáveis foi aferido pela exclusão do corante azul de Trypan, usada a 0.1%, utilizando uma câmara de Neubauer.

Populações enriquecidas de células T foram obtidas por filtração em coluna de lã de nylon de células esplênicas de acordo com o método de Julius e colaboradores (1973) (Julius *et al.*, 1973). As colunas de nylon (Fenwal Lab. Durfisd, IC, USA), foram lavadas com Hanks'. As colunas foram mantidas úmidas com Hanks' suplementado com 5% de soro fetal bovino e incubadas por 1 hora em estufa de atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub> a 37<sup>0</sup> C. Após este

período o homogenato total do baço foi colocado sobre a coluna de lã de nylon umedecida ( $10^8$  células para cada 0.6 g de lã compactada em seringas de 10ml) e incubadas por 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  em atmosfera úmida contendo 7% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida as células não aderentes, enriquecidas de linfócitos T, foram recuperadas do líquido emergente após lavagem da coluna numa velocidade padrões de 1 gota/2 segundos. Após sucessivas lavagens a densidade celular total por mL de meio foi calculada pelo método de exclusão em azul de trypan utilizando câmara de Newbauer. As células T esplênicas foram recuperadas em média de 25 % do total de células aplicado inicialmente à coluna.

#### **4.8. Obtenção de células Apoptóticas :**

##### **4.8.1. Pelo calor:**

Para baço apoptótico a suspensão celular foi ajustada para  $4 \times 10^7$ / mL de meio incompleto (DMEM- Gibco BRL, Life Technologies) e incubadas em banho-maria a  $43^{\circ}\text{C}$ / 30 minutos. Depois as células foram incubadas a temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas e depois tratadas de acordos com os experimentos.

Para obtenção de células T apoptóticas, as células purificadas foram submetidas ao mesmo tratamento descrito acima.

#### **4.8.2. Por irradiação:**

Para baço apoptótico a suspensão celular foi ajustada para  $4 \times 10^7$ / mL de meio incompleto e submetidas a 30Gy (3000 rads). Depois as células foram lavadas 2 vezes com meio e utilizadas nos experimento.

#### **4.9. Tratamento das células T apoptóticas:**

##### **4.9.1. Com os diferentes soros:**

Células T purificadas apoptóticas (indução pelo calor) foram ajustadas para uma concentração de  $8 \times 10^6$  células/ mL em três tubos separados. Em cada tubo foi adicionado 1% do soro crônico (SC), Crônico apoptótico (SCA) e normal (SN) e incubados por 30 minutos a 4°C.

Em seguida, as células foram lavadas três vezes para retirar o soro não adsorvido e usadas nos experimentos.

##### **4.9.2. Com as Imunoglobulinas purificadas:**

Células T purificadas apoptóticas (indução pelo calor) foram ajustadas para uma concentração de  $8 \times 10^6$  células/ mL em três tubos separados. Em cada tubo foi adicionado 5µg/ml de acordo com o experimento da IgG ou IgM purificadas dos diferentes soros e incubados por 30 minutos a 4°C.



Em seguida, as células foram lavadas três vezes para retirar a Ig não adsorvida e usadas nos experimentos.

#### **4.10. Obtenção do Extrato de Baço Apoptótico:**

Animais Balb/c 4-8 semanas foram sacrificados (3 animais) e o baço retirado assepticamente e processado em placa de petri contendo meio (Hank`s) gelado.

A suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. O pellet foi lisado com tampão de lise ACK, e lavadas 3 vezes.

A suspensão foi submetida à irradiação numa dose de 3000 rads para indução de apoptose, e depois colocadas em cultura por 1 hora em estufa a 37°C e 7% de CO<sub>2</sub>, e a viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão em azul de trypan , revelando uma mortalidade de cerca de 98%.

Após a morte das células a suspensão foi centrifugada e ressuspensa em tampão de Extração pH 6.8 (1.25 mL de Tris-HCl, 6,75 mL de água destilada e 2 mL de SDS a 10%) num volume de 10mL. Após a adição do SDS imediatamente a suspensão foi fervida por 10 minutos, depois centrifugada a 10000g (12000 rpm) por 10 minutos e o sobrenadante recolhido. A dosagem da concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Bradford .

#### **4.11. Co-cultura de macrófagos e células apoptóticas:**

As monocamadas de macrófagos peritoneais ( $2.5 \times 10^5$ /mL), foram infectadas numa proporção parasita:célula de 10:1 tripomastigotas de cultura de células ou metacíclicos. Após 18 horas de interação, as monocamadas foram exaustivamente lavadas para retirar os parasitas não interiorizados.

Células T apoptóticas previamente tratadas com 1% dos soros (SC, SCA, SN), com 1-5 µg/ml da IgG ou IgM purificadas dos diferentes soros, ou 10 µg/ml dos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> purificados das IgG obtidas dos diferentes soros foram adicionadas à monocamada na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL, num volume final de 500µL/poço. A placa foi incubada a 37<sup>0</sup>C em atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub> durante sete dias. Após este período, foi realizada a contagem dos parasitas (trípomastigotas) viáveis em câmara de Neubauer.

#### **4.12. Dosagem de citocinas:**

##### **TNF-α:**

Para quantificar a presença de TNF-α, sobrenadantes foram recolhidos das culturas após 24 horas e submetidos à técnica imunoenzimática (ELISA para “enzyme-linked immunosorbent assay”). Para isso, placas de 96 poços (Maxisorp-Nunc Demark) foram devidamente sensibilizadas com anticorpo de captura (4µg/mL) e deixadas por 18 horas a 4<sup>0</sup>C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução de PBS-Tween, bloqueadas com solução de PBS suplementada com SFB a 10% e incubadas a 37<sup>0</sup>C. Ao final de 2 horas as placas foram lavadas e as amostras, bem como os padrões, adicionados. As placas foram mantidas a 4<sup>0</sup>C por 18 horas e, depois lavadas exaustivamente para remover o material não adsorvido. Imediatamente, após a última lavagem dos poços, adicionou-se um volume de 100µL contendo o anticorpo de detecção a 2µg /mL que foi deixado por 1 hora a 37<sup>0</sup>C. Ao final deste tempo, as placas foram lavadas e 100µL de estreptoavidina-fosfatase-alcálica, diluída 1:2000 em solução de PBS suplementado com SFB a 10%, foi adicionado a cada poço e deixados por mais 1 hora a 37<sup>0</sup>C. Depois, a placa foi lavada 8 vezes e o volume de cada poço foi substituído por 100µL do substrato diluído em

tampão Tris-MgCl (pH 9.8). A leitura foi realizada num leitor automatizado BioRad (Modelo 3550-UV) utilizando filtro de 405 nm.

### **TGF- $\beta$ :**

Para quantificar a presença de TGF- $\beta$ , sobrenadantes foram recolhidos das culturas após 72 horas e submetidos à técnica imunoenzimática (ELISA para “enzyme-linked immunosorbent assay”). Para isso, placas de 96 poços foram devidamente sensibilizadas com anticorpo de captura (4 $\mu$ g/mL em PBS) e deixadas por 18 horas a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução de PBS-Tween (solução de lavagem), bloqueadas com solução de PBS contendo 5% de Tween 20, 5% de sacarose e 0.05% de NaN<sub>3</sub> e incubadas a temperatura ambiente. Ao final de 1 hora as placas foram lavadas e as amostras, bem como os padrões, adicionados. As placas foram mantidas a 4°C por 18 horas e, depois lavadas exaustivamente para remover o material não adsorvido. Imediatamente após a última lavagem dos poços, adicionou-se um volume de 100 $\mu$ L contendo o anticorpo de detecção a 2 $\mu$ g /mL que foi deixado por 2 hora à temperatura ambiente. Ao final deste tempo, as placas foram lavadas e 100 $\mu$ L de estreptoavidina-fosfatase-alcálica, diluída 1:2000 em solução de “Tris buffered saline” suplementado com BSA a 3 % e 0.05 % de tween 20, foram adicionados a cada poço e deixados por mais 1 hora a 37°C. Depois, a placa foi lavada 8 vezes e o volume de cada poço foi substituído por 100 $\mu$ L do substrato diluído em tampão Tris-MgCl (pH 9.8). A leitura foi realizada num leitor automatizado BioRad (Modelo 3550-UV) utilizando filtro de 405 nm.

OBS: Os sobrenadantes que foram submetidos ao ELISA para detecção de TGF- $\beta$ , foram previamente tratados com HCl 1N (1:25), incubados por 1 hora à 4°C, e depois neutralizados com NaOH 1N (1:25) e imediatamente testados.

#### **4.13. Análise por Western Blott:**

O extrato de baço foi submetido à SDS-PAGE 12% a 30 Volts, para separação das proteínas como descrito (Laemmli, E. 1970). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 50 Volts por 1 hora. Depois da transferência a membrana foi incubada *overnight* à 4°C com 10% de leite mólico em pó em tampão de lavagem para bloquear as ligações não específicas. Após lavagem as membranas foram incubadas com os soros testes (Soro Normal-CT e Soro Crônico Chagásico-CHA) e o padrão (Soro Imune), por 18 horas à 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário (anti-mouse IgG conjugado com peroxidase – Sigma Chemical ou anti- mouse IgM conjugado com peroxidase – Sigma Chemical) por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi detectada utilizando-se quimioiluminescência (ECL), em filme raios-X Hyperfilm-ECL desenvolvido de acordo com as instruções do fabricante (Amersham).

#### **4.14. Imunofluorescência:**

Macrófagos peritoneais foram retirados e colocados para aderir em lamínulas por 2 horas a 37°C. Depois as lamínulas foram lavadas e avaliadas no microscópio para observação da monocamada de macrófagos. Concomitantemente, células T de baço de camundongo foram induzidas a apoptose pelo calor. Depois tratadas com 1% dos diferentes soros (SN, SC, SI) por 1 hora a 4°C. As células foram lavadas e adicionadas a monocamada de macrófagos numa concentração de 10:1, deixando-as interagirem por cerca de 40 minutos. Depois, lavou-se a monocamada com hank's e fixou-se as células com paraformaldeído 1% por 10 minutos. Após esse procedimento as lamínulas foram lavadas e os anticorpos marcados (anti-IgM-Pe, controle e

anti-IgG-PE) adicionados e incubados por 30 minutos a 4°C, depois as lamínulas foram montadas e visualizadas ao microscópio.

#### **4.15. Ensaio de Fagocitose:**

Macrófagos na concentração de  $(5 \times 10^5)$  células foram aderidos em lamínulas e colocados em placas de 24 poços (Corning, NY) por 2 horas à 37°C. Linfócitos apoptóticos foram absorvidos com 10 µg/ml de IgG purificada como descrito, lavados e adicionados à monocamada de macrófagos em meio livre de soro por 3 horas à 37°C. As lamínulas foram lavadas, fixadas com metanol e coradas com May- Grunwald Giemsa. As células foram contadas (200 células por lamínula) para determinar a percentagem da fagocitose dos macrófagos, e o número de linfócitos fagocitados por 100 macrófagos.

#### **4.16. Análise Estatística:**

Os dados foram analisados pelo Student't test para amostras independentes, usando Sigma Plot para Windows. Diferenças com valores  $p \leq 0.05$  foram considerados significantes.

#### **4.17. Reagentes e Soluções:**

- Anticorpos monoclonais anti-citocinas (mantidos à 4°C após diluição):
- Purified rat anti-mouse TNF- $\alpha$  (Pharmlingen) usado a 4µg/mL
- Biotin rat anti-mouse TNF- $\alpha$  (Pharmlingen) Usado a 2 µg/mL

- Purified rat anti-mouse human, pig TGF-  $\beta$ (Pharmingen) usado a 4 $\mu$ g/mL
- Biotin rat anti-mouse, human, pig TGF- $\beta$  (Pharmingen) Usado a 2  $\mu$ g/mL
- Anti-CD16/CD32 mAb 2.4G2 (BD Biosciences, San Diego, CA)
- Rat IgG<sub>2b,  $\kappa$</sub>  isotipo controle mAb (BioSource Europe, Belgium)
- PE-labeled goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgM, goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG e fragmentos controle F(ab')<sub>2</sub> ( Southern Biotechnology, Birmingham, AL)
- Anti-TNF- $\alpha$  (clone MP6-XT3) mAb, e isotipo controle rat IgG1 mAb (BD-Biosciences).
- TNF- $\alpha$  recombinante (2 $\mu$ g/50 $\mu$ l- Pharmingen)
- TGF- $\beta$  recombinante (40  $\mu$ g//mL- Pharmingen)
- Solução salina balanceada de Hanks' (HBSS) (Gibco BRL, Life Technologies):
- Tampão de Lise-Cloreto de amônio tamponado (tampão ACK) (Sigma Chemicals Co.). Foi utilizado para remoção das hemácias das suspensões celulares antes da cultura.
- Estreptoavidina conjugada a fosfatase alcalina (Pharmingen) 1  $\mu$ g/mL;
- Paranitrofenol fosfato (PNPP) (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL), usado como substrato da estreptoavidina nos ensaios de ELISA (1 mg/mL);
- Meios de Cultura: Os macrófagos foram cultivados em meio DMEM (Gibco BRL, Life Technologies), suplementado com 1% de Nutridoma NS (Boehringer Mannheim), L-glutamina a 2mM (Sigma), 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol (ICN Biochemicals, Inc.), bicarbonato de sódio (2,0 g/L), piruvato de sódio (1 mM) (Sigma), aminoácidos não essenciais MEM 1 mM (Sigma) e HEPES a 10 mM. Esta solução foi denominada meio completo.
- RPMI (Gibco BRL, Life Technologies), utilizado para o cultivo de células Vero e obtenção de tripomastigota de cultura.

- Tampão de Eletroforese: Tris-base (Sigma) 3g; Glicina (Sigma) 14.4g; SDS (Sigma) 1g e água destilada qsp- 1000mL.
- Tampão de Transferência: Tris a 0.025M; Glicina a 0.192 M; Metanol a 20% e água deionizada qsp- 1000mL.
- Tampão de Lavagem: Tris-HCl a 0.02 M; NaCl a 0.5M; Tween 20 a 0.2% e água destilada qsp-1000mL.

## 5. Resultados

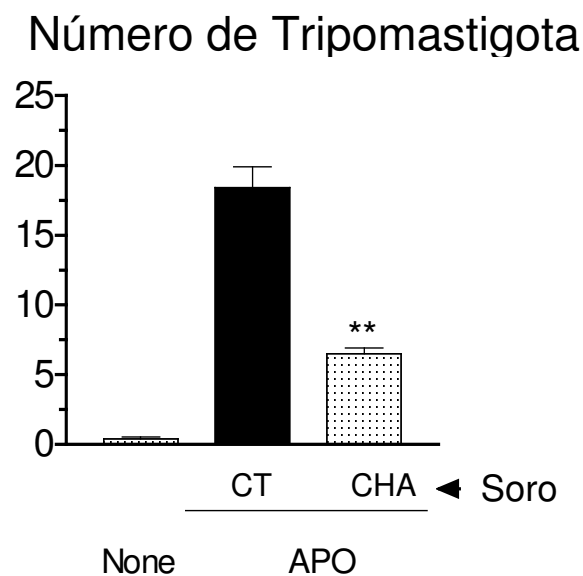
### ***1. Soro crônico chagásico interage com células T apoptóticas, e reduz a replicação do T. cruzi em macrófagos.***

Sabendo que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos infectados, favorece o aumento da liberação de parasitas (Freire-de-Lima, et al. 2000). Resolvemos avaliar se a opsonização de células T apoptóticas com o soro do animal cronicamente infectado teria efeito sobre o crescimento do parasita em macrófagos. Para isto, monocamada de macrófagos peritoneais residentes, obtidos de camundongo Balb/C normais, foram infectados com tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* e, co-cultivados com células T apoptóticas, induzidas pelo calor, previamente adsorvidas com os diferentes soros na concentração de 1%. Após 10 dias as culturas foram avaliadas.

Na interação das células T apoptóticas tratadas com o soro crônico (CHA), houve uma acentuada redução na liberação de parasitas quando comparado com o controle de células T apoptóticas, previamente tratadas com o soro do animal normal (CT). (Fig.1)

Esses resultados indicam que o tratamento das células T apoptóticas com o soro crônico chagásico reduz a habilidade do *T. cruzi* para se replicar nos macrófagos.





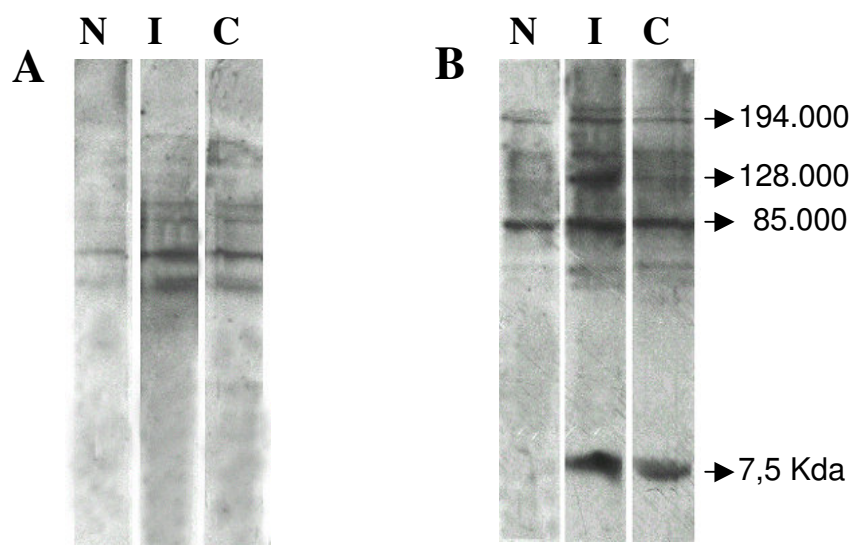
**Figura 1:** Monocamada de macrófagos peritoneais residentes, obtidos de camundongos Balb/C normais, foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos na proporção de 10: 1 e co-cultivadas com células T apoptóticas purificadas previamente e adsorvidas na presença de 1% do soro crônico (CHA), ou 1% do soro normal (CT). O número de tripomastigotas viáveis foi determinado após 7 dias. Os resultados são a média e SE de triplicatas. \*\* $p < 0.01$  para diferenças entre soro normal e chagásico. Experimento representativo de 3 experimentos com resultados idênticos.

## 2. Aumentada Reatividade de Autoanticorpos Contra Células Apoptóticas Presentes no Soro de Animais Chagásicos Crônicos (Western Blotting).

Para investigar se o soro crônico chagásico (CHA) apresentava anticorpos reativos contra células T apoptóticas, fizemos um lisado total de baço e o induzimos a apoptose por radiação (3000 rads). Esse lisado foi submetido à técnica de *Western Blotting*. Para isso o lisado foi separado em gel de poliacrilamida a 12.5%, e transferido para nitrocelulose.

O *Western blotting* foi feito usando soro de animal imunizado com baço apoptótico (controle positivo) e os soros crônico (CHA) e normal (control).

Na figura 2 observamos um aumento na reatividade do soro crônico chagásico (Cha), o que sugere a presença de autoanticorpos dos isotipos IgM e IgG.



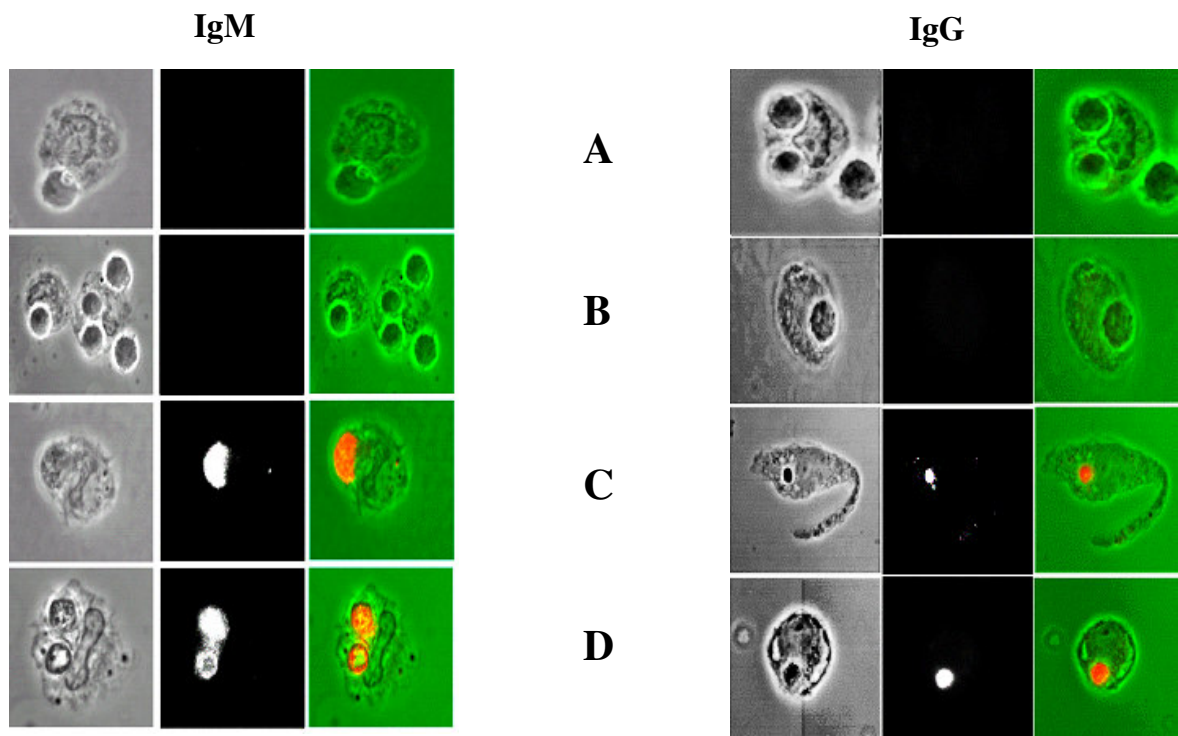
**Figura 2:** Extrato de células apoptóticas foram fracionados por SDS- PAGE 12%. Western blotting foi feito com soro normal (N), soro imune (I) ou soro crônico chagásico (C), respectivamente. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e reagidos com os diferentes soros e reveladas com : A) Rabbit anti-mouse IgM (HRP- conjugado); ou B) Rabbit anti-mouse IgG (HRP-conjugado). As membranas foram reveladas com ECL (Plus detection system). Experimento representativo de 3 experimentos com resultados idênticos.

### **3. Presença de Autoanticorpos contra células T apoptóticas no Soro Crônico Chagásico (Imunofluorescência).**

A análise pela técnica de imunofluorescência em co-cultura de células apoptóticas com macrófagos, foi feita com o intuito de confirmar a presença de autoanticorpos contra células T apoptóticas no soro crônico chagásico (CHA). (fig 3)

Para isso, monocamada de macrófagos peritoneais residentes obtidas de camundongos Balb/C foram aderidos em lamínulas e incubados por 30 minutos com linfócitos T apoptóticos purificados e pré-tratados com os 1% dos diferentes soros . Para evitar a ligação de anticorpos secundários ao receptor Fc, coramos as culturas com os fragmentos IgM F(ab')<sup>2</sup> anti-mouse PE ou IgG F(ab')<sup>2</sup> .

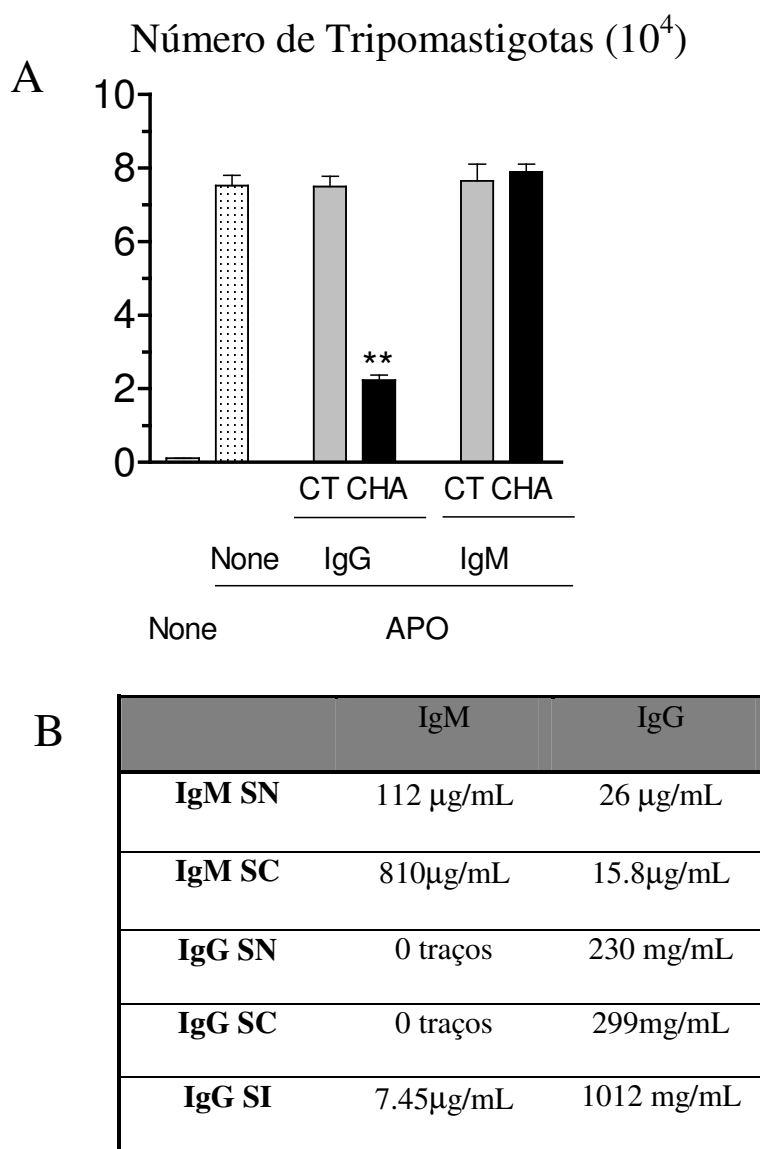
Os resultados mostraram que as células apoptóticas não tratadas, ou tratadas com o soro normal não coraram com o mouse IgM ou IgG (Fig.3A e B). Como controle positivo, células apoptóticas foram tratadas com soro de camundongo imunizado com linfócitos T apoptóticos, que continham anticorpos reativos contra células apoptóticas (Mevorach et al 1998). Este tratamento mostrou coloração positiva para ambos os anticorpos IgG e IgM contra células apoptóticas (Fig.3 D). Na figura 3 C indicou a presença de autoanticorpos dos isotipos IgM e IgG contra células T apoptóticas presentes no soro crônico chagásico.



**Figura 3:** Macrófagos peritoneais residentes obtidos de camundongos Balb/c normais foram incubados com células T esplênicas apoptóticas, previamente adsorvidas com soro normal, soro imune ou soro crônico chagásico por 30 minutos. As células foram coradas com goat  $F(ab)_2$  anti-mouse IgM-PE ou goat  $F(ab)_2$  anti-mouse IgG-PE e avaliadas ao microscópio ótico. A) Sem soro, B) Soro normal, C) Soro Crônico chagásico e D) Soro imune

***4. IgG purificada do Soro Crônico Chagásico interage com Células T apoptóticas e diminui a replicação do parasita em macrófagos.***

Após a forte sugestão da presença de autoanticorpos no soro dos animais cronicamente infectados com *T.cruzi* purificamos as imunoglobulinas presentes nesses soros por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G (IgG) ou MBP (IgM) para avaliar o papel desses autoanticorpos no controle da replicação do parasita. Dessa forma, as IgM e IgG purificadas foram utilizadas para opsonizar as células T apoptóticas na concentração de 5µg/mL. Nos experimentos de co-cultura de células apoptóticas opsonizadas com as imunoglobulinas purificadas e macrófagos infectados com tripomastigotas metacíclicos pudemos avaliar a interação dos macrófagos com as células T apoptóticas opsonizadas. A fagocitose das células apoptóticas opsonizadas com a IgG purificada do soro crônico chagásico (CHA) ocorreu uma acentuada redução na replicação do parasita quando comparadas com a IgG controle (CT) (Fig. 4 A). No entanto a IgM purificada não teve efeito. Esses resultados sugerem que os macrófagos estejam sendo ativados e conseqüentemente eliminando o parasita. Como controle da pureza dos reagentes (figura 4B) foi feito um ELISA, onde pudemos avaliar a pureza das imunoglobulinas purificadas.

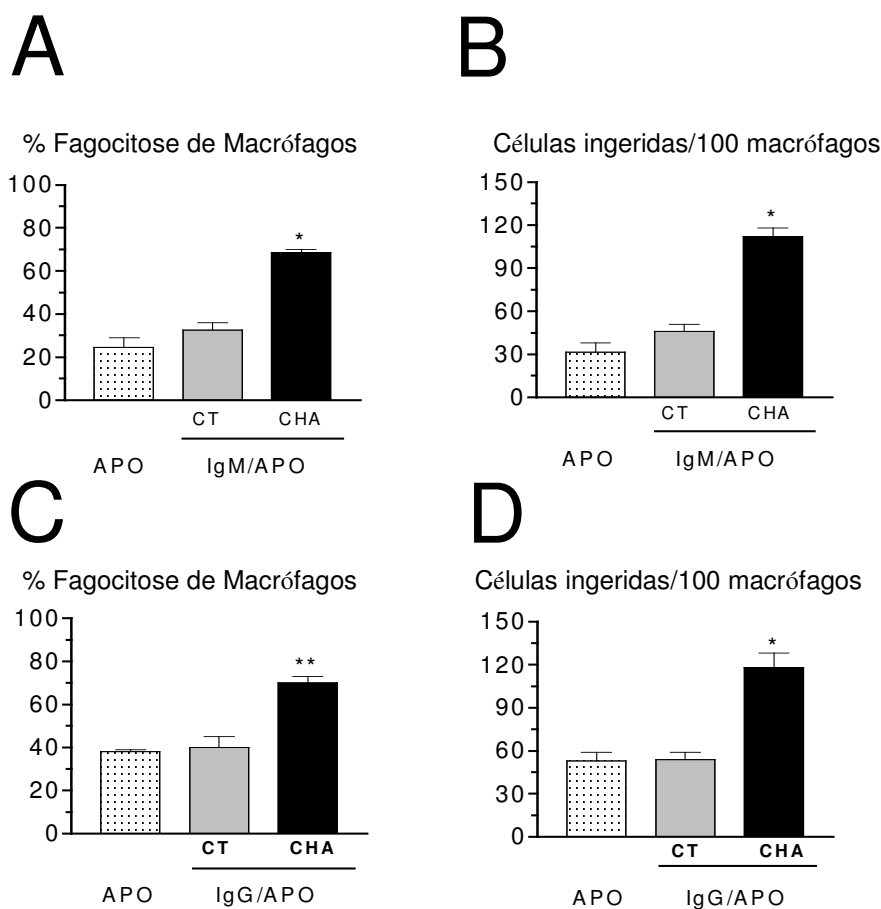


**Figura 4:** **A)** Monocamadas de macrófagos peritoneais residentes, obtidos de camundongos Balb/c normais, foram infectados com *T. cruzi* (tripomastigotas metacíclicos) na proporção de 10:1 e co-cultivados com células T apoptóticas purificadas previamente e opsonizadas na presença da IgG ou IgM (5µg/mL) purificadas do soro crônico (CHA) ou do soro normal (CT) . O número de tripomastigotas viáveis foi determinado após 7 dias. Os resultados são a média e SE de triplicatas. \*\*p< 0.01 para diferenças entre controle e IgG chagásica. Experimento representativo de 2 experimentos com resultados idênticos. **B)** A dosagem das imunoglobulinas purificadas foi feita pelo método de ELISA.

***5. Células T apoptóticas tratadas com IgM e IgG purificada do Soro Crônico Chagásico aumentam a fagocitose de macrófagos.***

Para avaliar se a imunoglobulina purificada do soro crônico chagásico (CHA) teria algum impacto sobre a fagocitose de macrófagos, experimentos com co-cultura de células T apoptóticas opsonizadas pela IgG ou IgM na concentração de 5µg/mL, purificadas dos diferentes soros (normal e crônico), e macrófagos peritoneais residentes, obtidos de camundongos Balb/c normais foram feitos.

Como mostrado na figura 5 a IgG e IgM obtida do soro crônico chagásico (CHA) foram capazes de propiciar um aumento na capacidade fagocítica de macrófagos quando comparados a IgM ou IgG controle (CT). Esses dados indicam que ambas IgM e IgG do soro chagásico opsonizaram os linfócitos apoptóticos facilitando a fagocitose por macrófagos.

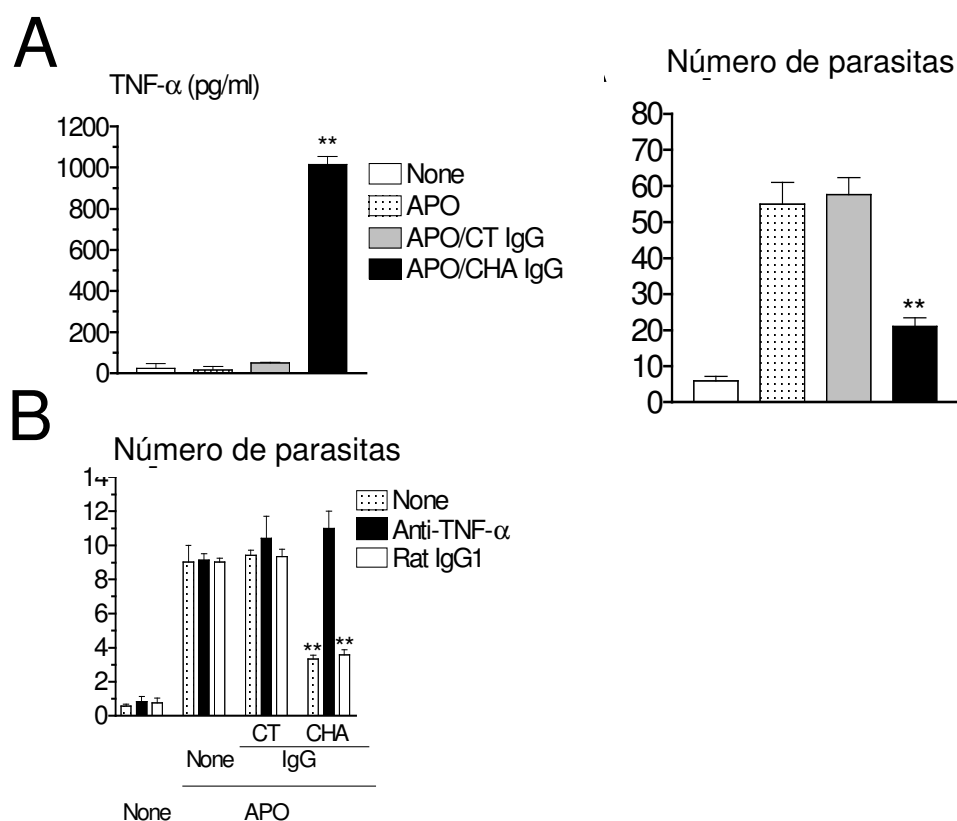


**Figura 5:** Monocamadas de macrófagos peritoneais residentes, obtidos de camundongos Balb/c normais, foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos (10:1) e co-cultivadas com células T apoptóticas purificadas previamente e opsonizadas na presença da IgM ou IgG (5µg/mL) purificada do soro crônico (CHA), IgM ou IgG purificada do soro normal (CT). A percentagem de fagocitose (A e C) e o número de células ingeridas /100 macrófagos (B e D) foi determinada após 3 horas em cultura. \*p < 0.05, e \*\*p < 0.01 para diferenças entre o controle e imunoglobulinas chagásicas. Experimento representativo de 2 experimentos com idênticos resultados.



***6. A IgG purificada do soro crônico chagásico opsonizou os linfócitos apoptóticos levando a produção de TNF- $\alpha$  e morte dos parasitas.***

Para avaliar a capacidade da IgG chagásica em modular a produção de citocinas, investigamos a secreção do TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados que fagocitaram os linfócitos opsonizados pela IgG. (Figura 6). A interação com linfócitos apoptóticos opsonizados pela IgG chagásica (CHA), na concentração de 5 $\mu$ g/mL induziu um aumento na secreção do TNF- $\alpha$ , comparado com a IgG controle (CT), ou com linfócitos apoptóticos sozinhos (Figura 6B). Concomitante com a elevação na produção de TNF- $\alpha$  houve uma redução da replicação do parasita em macrófagos (figura 6 A). Para confirmar se a produção de TNF- $\alpha$  seria a responsável pela morte do parasita por macrófago que ingeriram células T apoptóticas opsonizadas pela IgG purificada do soro crônico, experimentos de neutralização dessa citocina foram efetuados. A adição de um anticorpo monoclonal neutralizante contra TNF- $\alpha$  previniu o efeito protetor da IgG chagásica, levando a um aumento na replicação do parasita (Figura 6 C). O isotipo controle não teve efeito. A análise dos dados revelou que o bloqueio do TNF- $\alpha$  reverteu à morte do parasita induzida na presença da IgG do soro crônico. Esse resultado afirma que a produção dessa citocina é crucial no evento de redução da replicação do *T. cruzi* em macrófagos ativados pelo autoanticorpo.

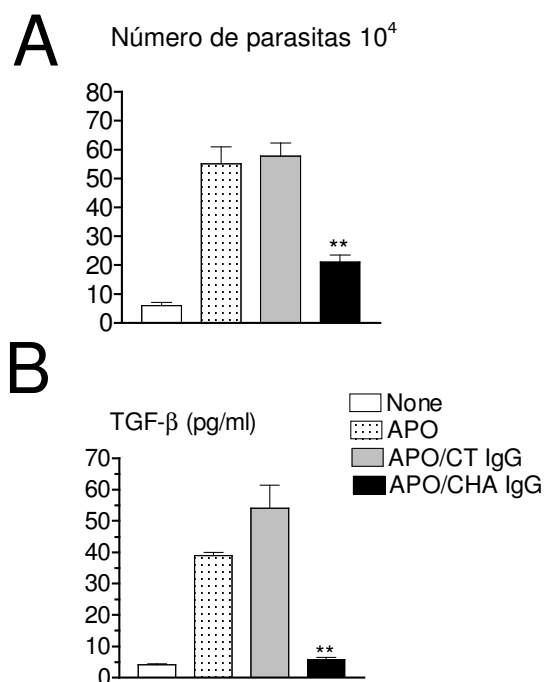


**Figura 6:** Monocamada de macrófagos peritoneais residentes, obtidos de camundongos Balb/c normais, infectados com tripomastigotas (10:1). A) Sobrenadante das co-culturas de macrófagos infectados com células T apoptóticas, opsonizadas com IgG do soro normal (CT IgG) ou IgG do soro chagásico (CHA IgG), sozinho (None) ou com células T apoptóticas (Apo), foram recolhidos após 48 horas de cultivo para a dosagem da produção de TNF- $\alpha$ . B) Para a neutralização do TNF- $\alpha$  as culturas receberam apenas meio (None), um mAb neutralizante anti-TNF- $\alpha$ , ou isotipo controle rat IgG1. O número de tripomastigotas viáveis foi determinado após 7 dias. Resultados são a média e SE de triplicatas. \*\* $p < 0.01$  para diferenças entre anti-TNF- $\alpha$  e meio ou controle IgG1. Experimento representativo de 2 experimentos com resultados idênticos.

***7. Células T apoptóticas tratadas com IgG purificada do Soro Crônico Chagásico controlam a replicação do parasita e Diminuem a Produção de TGF- $\beta$  por Macrófagos Infectados.***

A replicação exacerbada de *T. cruzi* induzida por células apoptóticas requer a produção de TGF- $\beta$  por macrófagos. (Freire-de-Lima et al 2000)

Para definir se o autoanticorpo purificado do soro dos animais chagásicos crônicos (CHA) estaria modulando a produção de citocinas nos macrófagos, que fagocitaram as células apoptóticas opsonizadas, experimentos de co-cultura de macrófagos com células apoptóticas opsonizadas com a IgG purificada foram feitos com o intuito de analisar a produção de TGF- $\beta$  nessas culturas. A análise dos sobrenadantes demonstrou que os macrófagos que foram co-cultivados com células T apoptóticas tratadas com IgG purificada do soro crônico (CHA), reduziram a liberação de TGF- $\beta$  no sobrenadante dessas culturas, comparadas com a IgG controle (Figura 7A). Essa diminuição na produção do TGF- $\beta$  foi concomitante com a redução da replicação do parasita (Figura 7.B). Sugerindo, que a interação de células T apoptóticas opsonizadas com os autoanticorpos foi capaz de ativar os macrófagos levando a morte do parasita.



**Figura 7:** Monocamadas de macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos Balb/c normais, infectadas com tripomastigotas (10:1) foram co-cultivadas com células T apoptóticas purificadas previamente e opsonizadas na presença da IgG purificada do soro crônico (CHA), IgG purificada do soro normal (CT) ou IgG ( $5\mu\text{g/mL}$ ). A) Contagem de tripomastigotas viáveis após 7 dias de cultura, e B) Os sobrenadantes foram coletados após 48 horas e, submetidos ao método de ELISA sandwich para detecção de TGF- $\beta$ . Resultados são a média SE de triplicatas de culturas. \*\* $p < 0.01$  para diferenças entre o controle e IgG chagásica.

### **8. O bloqueio do receptor Fc reverte à morte do parasita**

Os experimentos anteriores sugerem fortemente que os macrófagos, que ingeriram as células T apoptóticas opsonizadas pela IgG do soro crônico chagásico, estariam sendo ativados via receptor Fc (Fc $\gamma$ Rs).

Para confirmar essa hipótese foram feitos experimentos de bloqueio do receptor Fc. Num primeiro momento, utilizamos o anticorpo monoclonal anti-CD16/CD32 (24G2) para bloquear o receptor.

Os macrófagos infectados foram tratados previamente com o anticorpo monoclonal 2.4G2 ( $\alpha$ CD 16/32) ou com o isotipo controle. (Figura 8)

O engajamento do Fc $\gamma$  com o  $\alpha$ CD 16/32 em macrófagos infectados na presença de células T apoptóticas absorvidas com o soro crônico chagásico teve uma redução no número de parasitas mais acentuada que a observada em co-culturas de macrófagos infectados com células T apoptóticas tratadas com o soro crônico na ausência do  $\alpha$ CD 16/32.(Figura 8)

O tratamento dos macrófagos infectados com  $\alpha$ CD 16/32 nas co-culturas de células apoptóticas absorvidas com o soro normal não teve efeito (Figura 8).

Esses dados sugerem que as células T apoptóticas absorvidas com o soro crônico chagásico sinergizam com o engajamento do receptor Fc $\gamma$  para diminuir a replicação do parasita.

Para verificar se o bloqueio do receptor Fc seria capaz de impedir a ativação dos macrófagos pelos autoanticorpos e impedir a interferência do fragmento Fc do anticorpo bloqueador resolvemos utilizar um fragmento Fab monovalente do anticorpo monoclonal 2.4G2 como antagonista do Fc $\gamma$ R.

Na monocamada de macrófagos infectados pelo *T. cruzi* foi adicionada à fração Fab do anticorpo bloqueador e seu respectivo controle.

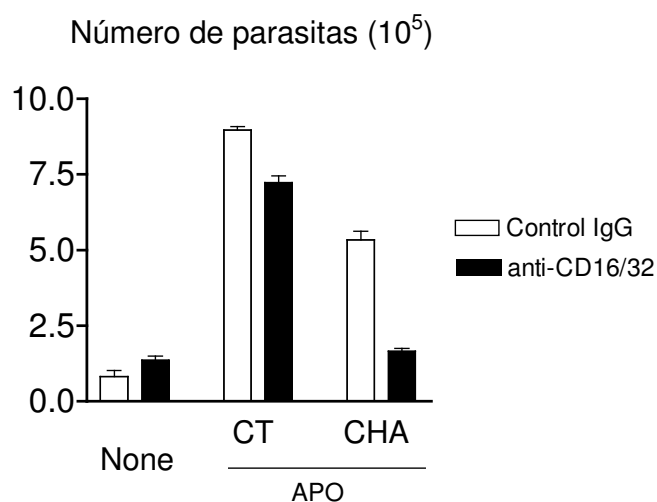
A figura 9 mostra que o bloqueio do receptor Fc foi capaz de reverter à morte do parasita induzida na presença do autoanticorpo comparados com o controle.

Esse resultado sugere fortemente que a morte do parasita é devida à ativação do macrófago pelo receptor Fc.

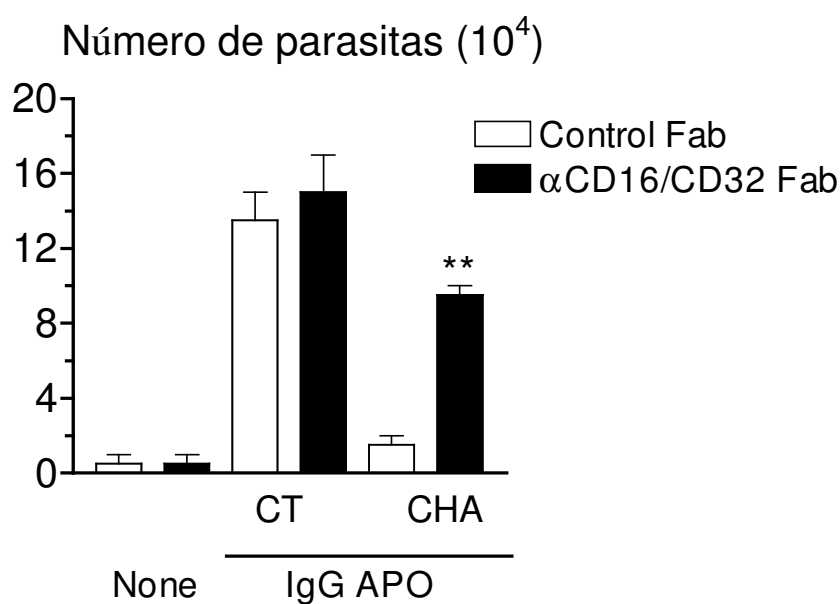
Para afirmar o papel do receptor Fc na via de ativação dos macrófagos pela Imunoglobulina G purificada do soro crônico chagásico, resolvemos utilizar a fração  $F(ab')_2$  da IgG purificada dos diferentes soros para opsonizar as células T apoptóticas.

A co-cultura de macrófagos infectados pelo *T. cruzi* e células T apoptóticas opsonizadas pela fração  $F(ab')_2$  foi realizada e pudemos verificar que a morte do parasita na presença da IgG do soro crônico foi interrompida quando apenas a fração  $F(ab')_2$  da imunoglobulina foi utilizada (figura 10).

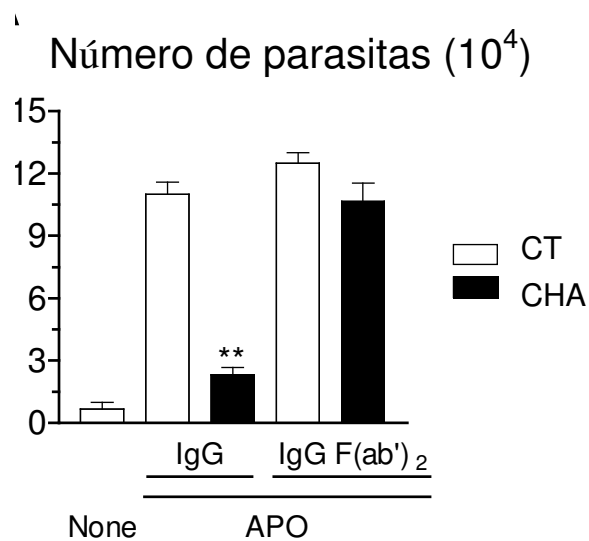
Esses dados mostram que os receptores Fc ( $Fc\gamma R$ s) estão envolvidos no efeito protetor propiciado pelos linfócitos opsonizados pela IgG chagásica.



**Figura 8:** Monocamada de macrófagos peritoneais foram infectadas com *T. cruzi* (10:1) foram co-cultivadas com células T apoptóticas purificadas previamente e adsorvidas na presença do soro crônico (CHA) ou soro normal (CT) (1%). Os Macrófagos foram previamente tratados com  $\alpha$ CD16/32 mAb 2.4G2 (5 $\mu$ g/mL), ou o isotipo IgG controle. O número de tripomastigotas viáveis foi determinado após 7 dias. Experimento representativo de 2 experimentos com resultados idênticos.



**Figura 9:** Monocamadas de macrófagos infectadas com *T. cruzi* foram co-cultivadas com células T apoptóticas purificadas previamente e opsonizadas com IgG fragmentos Fab do anti-CD16/32 mAb 2.4G2 (50  $\mu$ g/mL) ou IgG Fragmentos Fab do isotipo controle. \*\* $p < 0.01$  para diferenças entre o controle Fab e o anti-CD16/CD32 Fab. Experimento representativo de 2 experimentos com resultados idênticos. O número de tripomastigotas viáveis foi determinado após 7 dias.



**Figura 10:** Monocamadas de macrófagos infectadas com *T. cruzi* foram co-cultivadas com células T apoptóticas purificadas previamente e opsonizadas com fragmentos IgG F(ab)<sub>2</sub> purificada do soro crônico (CHA) ou IgG Fragmentos F(ab)<sub>2</sub> purificada do soro normal (CT) ou IgG.  $p < 0.01$  para diferenças entre o controle e IgG chagásica. Experimentos representativos de 2 experimentos idênticos.



## 6. Discussão

No curso da doença de Chagas ocorre a produção de autoanticorpos (Szarfman *et al.*, 1975). As células apoptóticas podem ser um alvo potencial para essas imunoglobulinas, já que a apoptose de linfócitos é freqüente no decorrer da infecção pelo *T. cruzi* (DOS REIS *et al.*, 2005), e células apoptóticas são imunogênicas, provocando a formação de autoanticorpos (Kim *et al.*, 2003). Nesta tese, nós investigamos como os autoanticorpos podem modificar o funeral fagocítico de células apoptóticas e a replicação do *T. cruzi* em macrófagos infectados. A eliminação das células apoptóticas por células fagocíticas é o evento final no programa de morte celular (FADOK *et al.*, 2000). A remoção ocorre antes da lise, o que previne a liberação de conteúdos tóxicos e imunogênicos para o tecido (FADOK *et al.* 1998a).

O processo de fagocitose de células apoptóticas é ativamente antiinflamatório, ou seja, ocorre à liberação de mediadores como TGF- $\beta$ , IL-10 e PGE<sub>2</sub>. (HENSON *et al.*, 2001; FADOK *et al.*, 2001; FREIRE DE LIMA *et al.*, 2006). Isso permite que a eliminação de células apoptóticas seja um processo silencioso sem a indução de resposta imune. No entanto, em situações de excesso de apoptose, ou deficiência nos mecanismos de remoção, existem evidências da correlação da apoptose com a indução de autoimunidade (CASCIOLA ROSEN *et al.*, 1996; LORENZ *et al.*, 2000; HERKEL *et al.*, 2001), pois antígenos de células apoptóticas tem sido amplamente reconhecidos como alvos de autoanticorpos num grande espectro de doenças autoimunes (EUGUCHI, K. 2001; CLINE & RADIC, 2004). Muitos trabalhos relacionam a deficiência de componentes da via clássica do complemento, como o C1q, como fator de predisposição para o desenvolvimento de autoimunidade (MORGAN & WALPORT, 1991; CLINE & RADIC, 2004). Essa deficiência acarreta uma diminuição na eliminação de células

apoptóticas, que são uma das maiores fontes de autoantígenos no Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) (MEVORACH, 2000).

A ocorrência de um desequilíbrio na razão entre apoptose e remoção dessas células pode permitir o extravasamento de conteúdos imunogênicos e gerar autoanticorpos e autoimunidade (CLINE & RADIC, 2004).

A contribuição da apoptose para a indução de resposta autoimune foi diretamente testada pela administração de células apoptóticas em animais experimentais. Vários grupos de pesquisadores observaram que autoanticorpos para antígenos nucleares e fosfolipídios são produzidos em resposta a cada tratamento. (LEVINE *et al*, 1998; MEVORACH *et al*, 1998; BONDANZA *et al* 2003). Antígenos nucleares são gerados e liberados durante a apoptose, CASCIOLA ROSEN e colegas (1994) demonstraram que esses autoantígenos estão presentes nos “blebs” na superfície de células apoptótica tornando-os importantes partículas imunogênicas (CASCIOLA-ROSEN *et al.*, 1994). Além disso, foi proposto que a fosfatidilserina exposta no exterior dos “blebs” pode também induzir a produção de anticorpos antifosfolipídios, reforçando a imunogenicidade desses “blebs” (CASCIOLA ROSEN, 1995; LORENZ *et al*, 2000).

Durante a infecção pelo *T. cruzi* ocorre um aumento na carga de células apoptóticas principalmente linfócitos T (LOPES *et al*, 1999). Esse aumento na apoptose de linfócitos T e B (SILVA *et al*, 2007) poderia gerar uma dificuldade na eliminação dessas células, o que acarretaria numa predisposição para a autoimunidade (RADIC *et al*, 2003). De acordo com essa possibilidade, anticorpos anti-nucleares (ANA), anti-fosfolipídios, e ribonucleoproteínas foram detectados na infecção experimental por *T. cruzi* e em pacientes chagásicos (BACH-ELIAS *et al.*, 1998). Estes anticorpos também estão elevados em modelos animais de imunização com excesso de células apoptóticas, ou com deficiência genética em mecanismos fagocíticos de remoção

(MEVORACH *et al*, 1998; EUGUCHI, K. 2001; FISHELSON *et al*, 2001; CLINE & RADIC, 2004).

Com base nesses dados resolvemos avaliar a presença de autoanticorpos contra células apoptóticas no soro de animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença e seu impacto na replicação do parasita em macrófagos.

A pré-incubação do soro, obtido de animais infectados na fase crônica da doença de Chagas, com células apoptóticas foi capaz de reduzir a replicação do parasita quando co-cultivadas com macrófagos infectados (Figura 1). Esses dados sugerem que o pré-tratamento das células apoptóticas com o soro crônico chagásico reduziu a habilidade do parasita de se replicar nos macrófagos.

Como descrito em vários trabalhos um aumento na concentração de células apoptóticas pode causar uma deficiência na eliminação dessas células e predisposição para a formação de autoanticorpos (revisto por RADIC & CLINE 2004).

Além disso, um trabalho recente de CHANG e colaboradores (2004) demonstrou diretamente que células apoptóticas tem um aumento de fosfolipídios oxidados (OxPLs) e que esses OxPLs oxidativamente modificados são imunogênicos. Además, a imunização de camundongos com células apoptóticas induziu altos títulos de autoanticorpos para vários epítomos dos OxPLs.

Uma outra evidência da possibilidade de células apoptóticas apresentarem antígenos próprios para o sistema imune de uma forma que quebra os mecanismos normais de tolerância é a presença de autoanticorpos contra diferentes antígenos de células apoptóticas em animais imunizados com essas células (MEVORACH *et al*, 1998; GENSLER *et al*, 2001). Camundongos imunizados com células apoptóticas são capazes de gerar autoanticorpos contra componentes celulares como DNA e cardiolipina, sugerindo que as células mortas não somente servem como

alvos para os autoanticorpos, mas também provêem autoantígenos que produzem a resposta autoimune.

A doença de Chagas é uma infecção que leva a produção exacerbada de células apoptóticas (LOPES *et al*, 1999; DE MÉIS *et al*, 2006), e a exposição sistêmica dessas células estimula a produção de autoanticorpos reativos contra células apoptóticas. Dessa forma, resolvemos avaliar a possibilidade da presença de autoanticorpos no soro dos animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. Para acessar essa possibilidade estudamos a reatividade do soro de animais na fase crônica da doença de Chagas sobre lisado de baço apoptótico. A figura 2 revelou um aumento na reatividade do soro crônico o que sugere a presença de autoanticorpos contra células apoptóticas.

Com o intuito de confirmar a presença desses autoanticorpos no soro de animais chagásicos crônicos analisamos pela técnica de imunofluorescência os diferentes soros (figura 3). Nossos resultados demonstraram a presença de autoanticorpos dos isotipos IgM e IgG reativos contra linfócitos apoptóticos no soro de camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi*. A estrutura molecular reconhecida por esses autoanticorpos não foi determinada. No entanto, existe uma grande variedade de antígenos provenientes de células apoptóticas reconhecidos por autoanticorpos (CASCIOLA ROSEN *et al.*, 1995; MEVORACH *et al.*, 1998a). Esses resultados nos levaram a purificação dessas imunoglobulinas para confirmar o seu papel na opsonização dos linfócitos apoptóticos e conseqüente ativação dos macrófagos infectados em nosso sistema.

A utilização da imunoglobulina purificada isotipo IgG do soro chagásico crônico foi capaz de mimetizar os mesmos efeitos induzidos pelo soro crônico (Figura 4). O isotipo IgM não teve nenhum efeito observado na carga parasitária (figura 4), nem na produção de TNF- $\alpha$  (dados não mostrados).

Os receptores fagocíticos envolvidos no reconhecimento e na fagocitose das células apoptóticas são importantes para o tipo de resposta imune induzida. Os receptores que contribuem para o reconhecimento de células apoptóticas possuem um papel crucial na geração de uma resposta anti-inflamatória e na prevenção de uma resposta imune adquirida (FADOK *et al*, 2001; HENSON *et al*, 2001; HUYNH *et al*, 2002; LUCAS *et al.*, 2006). Contudo, existem receptores que quando engajados levam a ativação do macrófago e elicitação de Resposta imune.

O anticorpo IgM é capaz de se ligar na superfície de células apoptóticas através da porção Fab`do anticorpo. A exposição de fosfolipídios na membrana da célula apoptótica aumenta a ligação do IgM, que reconhece fosfolipídios alterados na superfície dessas células, e leva a ativação do complemento aumentando a fagocitose por facilitar o reconhecimento e ingestão dessas células mortas. (KIM *et al*, 2003; PENG *et al*, 2005; OGDEN *et al*, 2005). O IgM possui um papel importante na via clássica de ativação do complemento e eliminação de células apoptóticas, já que a fagocitose de células mortas mostrou-se reduzida em animais com deficiência de IgM no soro (OGDEN *et al*, 2005; TUOMINEN *et al*, 2006).

Estudos prévios mostraram que a opsonização por complemento é requerida para uma fagocitose de células apoptóticas eficiente, e que a captura dessas células opsonizadas está associada com a expressão de citocinas antiinflamatórias como o TGF- $\beta$  (GERSLOV *et al*, 2000). O reconhecimento de células mortas por IgM é, em parte, responsável pela ativação do complemento e leva a eficiente eliminação das células apoptóticas. (KIM *et al*, 2003). Assim o IgM contribui para a eficiente opsonização e captura de células apoptótica, aumentando a fagocitose dessas células por macrófagos (GAIPL *et al*, 2006).

Nossos resultados mostraram que o IgM do soro crônico chagásico opsonizou os linfócitos apoptóticos e aumentou a capacidade fagocítica dessas células (figura 5 A e B).

Com base nos dados acima podemos inferir que o anticorpo IgM esteja atuando como um acelerador na eliminação de células apoptóticas. É provável que a IgM tenha um papel anti-inflamatório em nosso sistema, pela ativação do complemento, formação e deposição de iC3b em células apoptóticas. No entanto, nós não investigamos o papel do complemento no presente estudo.

A opsonização de substratos com IgG desencadeia uma cascata de sinalização, através do “clustering” dos receptores Fc $\gamma$  da superfície celular, que aceleram o processo de engulfamento e ativa a geração de vias microbicidas (CANETTI *et al*, 2003 ).

Previamente foi demonstrado que a opsonização com soro imune pode aumentar a fagocitose. Já foi provado que a IgG opsoniza partículas para a fagocitose através dos Fc $\gamma$ Rs. O engajamento do receptor Fc (FcR) pode aumentar funções pró-inflamatórias de macrófagos, incluindo a produção de ROI e produção de citocinas por essas células, levando a um aumento na capacidade microbicida e fagocítica de macrófagos (UPPINGTON *et al*, 2006).

Em nosso estudo, quando as células apoptóticas foram incubadas com a IgG purificada desse soro essas células foram opsonizadas aumentando a capacidade fagocítica dos macrófagos (figura 5 C e D).

Anticorpos da classe IgG constituem parte crítica do sistema imune humoral. O efeito protetor dessa imunoglobulina resulta em parte da sua capacidade de estimular fagócitos profissionais como monócitos, macrófagos, e neutrófilos (NICHOLS *et al*, 2004).

Nossos resultados sugerem que a opsonização de células apoptóticas pode ter um papel imunoprotetor na infecção pelo *T. cruzi*. Enquanto que as células apoptóticas sozinhas exacerbam o crescimento do parasita em macrófagos (FREIRE DE LIMA *et al*, 2000).

O anticorpo IgG contra células apoptóticas foi capaz de ativar os macrófagos levando a eliminação dos parasitas (Figura 4).

A redução no crescimento do parasita está associada com um aumento na secreção de TNF- $\alpha$  (Figura 6 A e B) e redução na produção de TGF- $\beta$  por macrófagos infectados (Figura 7 A e B). Os linfócitos pré-tratados com IgG controle não foram capazes de induzir a secreção de TNF- $\alpha$  (Figura 6 B), e também não reduziram a produção de TGF- $\beta$  (Figura 7 B). Esse resultado sugere que a concentração de anticorpo natural presente na IgG controle contra células apoptóticas é insuficiente para gerar qualquer efeito comparadas com a IgG chagásica.

A neutralização do TNF- $\alpha$  eliminou o efeito protetor do linfócito opsonizado na redução da replicação do parasita em macrófagos (Figura 6 C). Esse resultado demonstra que a interação das células apoptóticas opsonizadas pelo IgG chagásico ativa os macrófagos infectados que passam a produzir TNF- $\alpha$  e eliminar o parasita.

Resultados de nossos trabalhos mostraram evidências de que os receptores Fc $\gamma$ Rs estariam envolvidos nos efeitos proinflamatórios induzidos pelos linfócitos opsonizados com IgG chagásico.

Os receptores Fc para imunoglobulinas (FcRs) possuem um papel importante na ativação e modulação negativa da resposta imune. Através da sinalização balanceada dos FcRs por receptores de ativação (presença da seqüência ITAM no domínio intracitoplasmático) ou inibição (presença da seqüência ITIM) regulam a atividade de várias células do sistema imune. (Revisto por RAVETCH & BOLLAND, 2001; TAKAI, 2002)

O anticorpo monoclonal 24G2 anti CD16/CD32 intacto é um ligante agonista para o Fc $\gamma$ R (YOUNG *et al*, 1984). Em nosso sistema foi detectado um sinergismo entre 24G2 intacto e linfócito T opsonizado no controle da replicação do parasita (Figura 8). Com o objetivo de

impedir a interferência do fragmento Fc no bloqueio do Fc $\gamma$ R linfócitos apoptóticos opsonizados foram co-cultivados com macrófagos infectados previamente bloqueados com fragmentos Fab monovalente anti-CD16/CD32, esse tratamento aboliu o efeito protetor de eliminação do parasita (figura 9). Mostrando que para a observação desse efeito é necessário o engajamento do receptor Fc $\gamma$ R com a porção Fc da IgG chagásica.

Em camundongos o CD32 corresponde ao Fc $\gamma$  RIIB um receptor Fc $\gamma$ R inibitório que possui uma seqüência ITIM no seu domínio citoplasmático. (RAVETCH & BOLLAND, 2001; GERBER & MOSSER, 2001). Esses dados nos levam a hipótese de que os efeitos proinflamatórios induzidos por linfócitos apoptóticos opsonizados com a IgG chagásica seja induzido pela ligação ao CD16, já que o CD32 é um receptor inibitório. No entanto, experimentos futuros com animais KO serão necessários para estabelecer o papel do CD16 em nosso sistema.

Confirmando o papel do receptor Fc $\gamma$ R no efeito imunoprotetor de linfócitos opsonizados as células T que foram pré-tratadas com os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> da IgG chagásica foram incapazes de reduzir a replicação do parasita em macrófagos (figura 10). Esses resultados mostraram que a porção Fc da IgG chagásica foi requerida para a indução de seu efeito protetor.

Nossos dados sugerem um papel crucial dos receptores Fc $\gamma$ R na indução do efeito protetor no controle do crescimento do parasita em macrófagos.

Durante a infecção pelo *T. cruzi* existe a indução de apoptose. (TARLETON & ZHANG, 1999). O grande alvo dessa morte celular são os linfócitos T. Na fase aguda da doença de Chagas ocorre um aumento na expressão da molécula Fas, o que leva a aumentada apoptose de células T CD4<sup>+</sup>. (LOPES & DOS REIS, 2000; SHARMA *et al.*, 2000).

A elevada taxa de apoptose pode gerar uma deficiência na eliminação de células mortas por fagócitos. (LORENZ *et al.*, 2000; PITTONI & VALESINI, 2002; LICH *et al.*, 2003).



Nesse contexto, onde existe a produção de autoanticorpos contra células apoptóticas e indução de apoptose pela infecção, a eliminação dessas células por fagócitos pode seguir duas vias distintas: uma antiinflamatória e outra proinflamatória.

A fagocitose de células apoptóticas é um evento antiinflamatório ativo com produção de mediadores como o TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (FADOK *et al.*, 1998a; FREIRE DE LIMA *et al.*, 2006).

O reconhecimento de células mortas por fagócitos é feito por uma série de moléculas presentes na superfície dessas células como a fosfatidilserina (Ptser). Além disso, proteínas solúveis como o C1q, C3bi e  $\beta_2$  glicoproteína são opsoninas que se ligam na superfície da célula apoptótica facilitando assim o reconhecimento e eliminação dessas células por fagócitos (Revisto por PITTONI & VALESINI, 2002; NAUTA *et al.*, 2004).

O IgM se liga na superfície de células apoptóticas, pois reconhece fosfolipídeos alterados, levando a ativação do complemento (C1q, iC3b) e aumentando a fagocitose por facilitar o reconhecimento e ingestão de células mortas. (OGDEN *et al.*, 2001; GAJPL *et al.*, 2006).

Todos esses mecanismos levam a liberação de mediadores antiinflamatórios que desativam a resposta imune.

Em nosso sistema podemos inferir que o autoanticorpo do isotipo IgM presente na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* funcione como opsonina, facilitando o reconhecimento e ingestão das células apoptóticas.

Por outro lado, o anticorpo IgG funcionando como opsonina é capaz de ativar fagócitos por se ligar aos receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ Rs) (CANETTI *et al.*, 2003).

Nosso trabalho descreveu um mecanismo imunoprotetor para o IgG chagásico, no qual o autoanticorpo ao se ligar à célula apoptótica foi capaz de levar a ativação dos macrófagos e redução da parasitemia. Essa ativação era dependente dos Fc $\gamma$ Rs.

Este mecanismo descrito seria importante na fase crônica da doença de Chagas e poderia ter um papel no controle da replicação do parasita. No entanto, num ambiente fisiológico o parasita poderia não ser eliminado, já que a fagocitose de células apoptóticas mediada pelo IgM e complemento levaria a desativação dos fagócitos com produção de citocinas antiinflamatórias. Isso funcionaria como um contrabalanço à fagocitose proinflamatória mediada pelo autoanticorpo IgG.

Nossos resultados demonstraram que o anticorpo IgG elicitado pela infecção por *T. cruzi* opsonizou linfócitos apoptóticos e previniu a replicação do parasita em macrófagos por mecanismos dependentes dos receptores Fc $\gamma$ Rs.

Pesquisas futuras serão necessárias para identificar os epítomos alvos desses autoanticorpos e sua importância na patogênese da doença de Chagas.

## 7. Conclusão

- A adsorção de Células T apoptóticas com o soro crônico chagásico reduz a habilidade do *T. Cruzi* para se replicar nos macrófagos.
- Células T apoptóticas adsorvidas aumentam a produção de TNF- $\alpha$  e reduz a produção de TGF- $\beta$  por macrófagos.
- O Soro Crônico Chagásico contém autoanticorpos dos isotipos IgM e IgG reativos contra células T apoptóticas.
- A opsonização de células apoptóticas por autoanticorpos IgM ou IgG facilitam a fagocitose por macrófagos.
- A opsonização de células apoptóticas pelo IgG chagásico possui um papel imunoprotetor na infecção pelo *T. cruzi*.
- A interação das células apoptóticas opsonizadas pelo IgG chagásico ativam os macrófagos infectados que passam a produzir TNF- $\alpha$  e eliminar o parasita.
- O efeito protetor de eliminação do parasita observado necessita do engajamento do receptor Fc $\gamma$ R com a porção Fc da IgG chagásica.
-

- Nossos resultados demonstraram que o anticorpo IgG elicidado pela infecção por *T. cruzi* opsonizou linfócitos apoptóticos e previniu a replicação do parasita em macrófagos por mecanismos dependentes dos receptores Fc $\gamma$ Rs.
- Os resultados sugerem que a presença de autoanticorpos IgG contra células apoptóticas podem desempenhar um papel no controle da replicação do parasita em macrófagos. No entanto, este mecanismo deve ser antagonizado pela opsonização de células apoptóticas por componentes do complemento.

## 8. Referências

1. ADAMS, J. M. & CORY, S. (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival". Science, **281**. 1322-1326.
2. ALBERT, M.L; PEARCE, S.F; FRANCISCO, L.M; SAUTER, B; ROY, P; SILVERSTEIN, R.L & BHARDWAJ. N. "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha v beta 5 and CD36, and cross present antigens to cytotoxic T lymphocytes." (1998). Journal Experimental Medicine, **188**. 1359-1368.
3. AMARANTE-MENDES, G.P & GREEN, D.R "The regulation of apoptotic cell death" (1999). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, **32(9)**. 1053-61.
4. ANDRADE SG, FREITAS LA, PEYROL S, PIMENTEL AR, SADIGURSKY M. "Experimental chemotherapy of Trypanosoma cruzi infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice." (1991). Bull World Health Organ. **69(2)**:191-7.
5. ANTONSSON, B. & MARTINOU J.C. (2000). "The Bcl-2 protein family". Exp Cell, **256**. 50-57.
6. BACH-ELIAS, M; BAHIA, D; TEIXEIRA, D.C & CICARELLI, R.M. "Presence of autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein epitopes in Chagas' patients' sera" (1998). Parasitol Res. **84**: 796-799.
7. BEVERS, E.M; COMFURIUS, P; DEKKER, D.W. & ZWAAL, R.F. "Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells." (1999). Biochim. Biophys Acta. **1439**. 317-330.
8. BOLDIN, M. P.; VARFOLOMEEV, E. F.; PANCER, C.; METT, I. L.; CAMONIS, J. H. & WALLACH, D. "A novel Protein that interacts with the death domain of Fas/Apo1 contains a sequence -Motif related to the death domain" (1995). Journal Biological Chemistry, **270**. 7795-98.

9. BOLDIN, M. P.; GONCHAROV, T. M.; GOLTSEV, Y. V. & WALLACH, D. "Involvement of MACH, a Novel MORT1/FADD-Interacting Protease, in Fas/APO-1- and TNF Receptor-Induced Cell Death" (1996). Cell, **85**. 803-815.
10. BONDANZA A, ZIMMERMANN VS, DELL'ANTONIO G, DAL CIN E, CAPOBIANCO A, SABBADINI MG, MANFREDI AA, ROVERE-QUERINI P. "Cutting edge: dissociation between autoimmune response and clinical disease after vaccination with dendritic cells." (2003). J .Immunol. **170(1)**:24-7.
11. BOTTO, M; DELL'AGNOLA C, BYGRAVE AE, THOMPSON EM, COOK HT, PETRY F, LOOS M, PANDOLFI PP, WALPORT MJ. "Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies". (1998) Nat Genet.; **19(1)**:56-9.
12. BOTTO, M & WALPORT, MJ. "C1q, autoimmunity and apoptosis" (2002). Immunobiology. **205(4-5)**:395-406.
13. BUENDIA, B; SANTA MARIA, A & COURVALIN, J.C. "Caspase dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear e and nuclear pore complex proteins during apoptosis" (1999). Journal Cell Science, **112**. 1743-1753.
14. BRATON, DL. "Apearance of PS on Apo cells requires calcium mediated nonspecific Flip-Flop and is enhanced by loss of aminophospholipid translocase."(1997). Journal Biological chemistry, **272 (42)**: 26159-26165.
15. BRENIERE SF, CARRASCO R, REVOLLO S, APARICIO G, DESJEUX P, TIBAYRENC M. "Chagas' disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodeme variability of Trypanosoma cruzi strains isolated from patients."(1989). Am J Trop Med Hyg. **41(5)**:521-9.
16. CAIN, K.; BROWN, D. G.; LANGLAIS, C. & COHEN, G.M. "Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700Kda) caspase-activating complex". (1999). Journal Biological Chemistry, **274**. 22686-22692.
17. CAIN, K; BRATTON, S.B; LANGLAIS, C; WALKER, G; BRAUN, D.J; SUN, X.M & COHEN, G.M. "Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximatly 700Kda and inactive approximately 1.4 Mda apoptosome complexes."(2000) Journal of Biological chemistry, **275**. 6067-6070.

18. CANETTI C, HU B, CURTIS JL, PETERS-GOLDEN M. "Syk activation is a leukotriene B4-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells." (2003). Blood.**102(5)**:1877-83.
19. CASCIOLA-ROSEN, L; ANHALT, G & ROSEN, A. "Autoantigens targeted in Systemic Lupus Erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic Keratinocytes" (1994). Journal Experimental Medicine, **179**. 1317-1330.
20. CASCIOLA-ROSEN, L; ANHALT, G & ROSEN, A. "DNA-dependent protein kinase is one of subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis" (1995). Journal Experimental Medicine, **182**. 1625-1634.
21. CASCIOLA-ROSEN, L; ROSEN, A; PETRI, M & SCHLISSEL, M. "Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: Implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus" (1996). Proc Natl Acad Sci USA, **93**. 1624-1629.
22. CASCIOLA-ROSEN, L; ANDRADE, F; ULANET, D; WONG, W.B & ROSEN, A. "Cleavage by Granzyme B is strongly predictive of autoantigen Status: Implications for Initiation of Autoimmunity."(1999).Journal Experimental Medicine, **190** (6): 815-825
23. CHANG, M.K. "Monoclonal antibodies against oxidized low density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophages recognition" (1999). Proceedings Natl. Acad Science USA, **96**. 6353-6358.
24. CHANG, MK; BINDER, C.J; MILLER, Y.I; SUBBANAGOUNDER, G; SILVERMAN, G.J; BERLINER, J.A & WITZTUM, J.L. "Apoptotic cells with oxidation specific epitopes are immunogenic and proinflammatory" (2004). The Journal of Experimental Medicine, **6**: 1359-1370.
25. CHIANNAIYAN, A. M.; TEPPER, C. G.; SELDIN, M. F.; O'ROURKE, K.; KISCHEKEL, F. C.; HELBARDT, S.; KRANMER, P. H.; PETER, M. E. & DIXIT, V. M. "FADD/MORT-1 is a common mediator of CD95 (Fas/ Apo1) and Tumor Necrosis Factor Receptor- induced Apoptosis" (1996). Journal of Biological Chemistry, **271**. 4961-65.
26. CLINE, A.M & RADIC, M.Z. "Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity" (2004). Clinical Immunology, **112**: 175-182.

27. COHEN, G. M. "Caspases: the executioners of apoptosis" (1997). Biochemical Journal, **326**. 1-16
28. CONTRERAS VT, SALLES JM, THOMAS N, MOREL CM, GOLDENBERG S. "In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions."(1985). Mol Biochem Parasitol. **16(3)**:315-27
29. CORY, S.; HUANG, D.C, & ADAMS, J.M. "The Bcl2 family: roles in cell survival and oncogenesis."(2003). Oncogene, **22**: 8590-8607.
30. CUNHA-NETO, E; COELHO, V; GUILHERME, L; FIORELI, A; STOLF, N & KALIL, J. "Autoimmunity in Chagas' disease" (1996). Journal Clinical Investigation, **98**. 1709-1712.
31. DE MEIS, J.; MENDES-DA-CRUZ, D.A; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D.A; CORRÊA-DE-SANTANA, E; PINTO-MARIZ, F; COTTA-DE-ALMEIDA, V; BONOMO, A & SAVINO, W. "Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas" disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRZI/TNF pathways"(2006). Microbes infect.,**8**: 221-231.
32. DINI, L; AUTUORI, F; LENTINI, A; OLIVERIO, S & PIACENTINI, M. "The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor". (1992). FEBS Letter, **296**. 174-178.
33. DIGHIERO, G & ROSE, N.R. "Critical self epitopes are key to the understanding of self tolerance and autoimmunity". (1999). Immunology Today, **20**. 423-428.
34. DOS REIS, G; FREIRE DE LIMA, C.G.; NUNES, MP & LOPES, M.F. "The Importance of aberrant T-Cell responses in Chagas Disease". (2005). TRENDS in parasitology, **21 (5)**: 237-43.
35. DOS SANTOS RR, ROSSI MA, LAUS JL, SILVA JS, SAVINO W, MENGEL J. "Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi." (1992).J Exp Med. **175(1)**:29-39.
36. DUFFIELD, J.S; ERWING, L.P; WEI, X; LIEW, F.Y; REES, A.J & SAVILL, J.S. "Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells" (2000). The Journal of Immunology, **164**. 2110-2119.



37. EGUCHI, K “Apoptosis in autoimmune diseases” (2001). International Medicine, **40** (4). 275-284.
38. ENARI M; SAKAHIRA, H; YOKOYAMA, H; OKAWA, K; IWAMATSU, A & NAGATA, S “A caspase activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD” (1998). Nature, **391**. 43-50.
39. ERIKSSON U, RICCI R, HUNZIKER L, KURRER MO, OUDIT GY, WATTS TH, SONDEREGGER I, BACHMAIER K, KOPF M, PENNINGER JM. “Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity” (2003). Nat Med. **9(12)**:1484-90.
40. EZEKOWITZ, R.A. “Local opsonization for apoptosis?”(2002). Nature Immunology, **3** (6): 510-512.
41. FADOK, V.A, BRATTON, D.I; KONOWAL, A; FREED, P.W; WESTCOTT, J.Y & HENSON, P.M.” Macrophages that have ingested Apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> and PAF”. (1998a). Journal Clinical Invest, **101**. 890-898.
42. FADOK, V.A, BRATTON, D.I, FRASCH, SC; WARNER, M.I. & HENSON, P.M. “The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytosis see comments. (1998b). Cell Death Differ.**5**. 551-562.
43. FADOK, V.A, BRATTON, D.I, ROSE, D.M; PEARSON, A; EZEKEVITZ, R.A & HENSON, P.M. “A receptor for phosphatidylserine specific clearance of apoptotic cells” (2000). Nature, **405**. 85-90.
44. FADOK. V.A & CHIMINI, G. “The phagocytosis of apoptotic cells” (2001). Seminars Immunology
45. FADOK, V.A; DE CATHELINEAU, A; DELEKE, D.E; HENSON, P.M. & BRATTON, D.L.” Loss of asymetry phospholipide and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts” (2001). Journal of Biological Chemistry, **276**. 1071-1077.

46. FEDOSEYEVA, E.V; ZHANG, F; ORR, P.L; LEVIN, D; BUNCKE, H.J & BENICHO, G. “De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process”. (1999). The Journal of Immunology, **162**. 6836-6842.
47. FERRI, K.F & KROEMER, G. “Organelle-Specific initiation of cell death pathways” (2001). Nature Cellular Biology, **3**. E255-263.
48. FISHELSON, Z, ATTALI, G & MEVORACH, D. “Complement and apoptosis” (2001). Molecular Immunology, **38**. 207-219.
49. FREIRE-DE-LIMA, C.G; NASCIMENTO, D.O; SOARES, M.B; BOZZA, P.T; CASTRO-FARIA-NETO, H.C; DE MELLO, F.G; DOS REIS, G.A & LOPES, M.F. “Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages” (2000). Nature, **403**. 199-203.
50. FREIRE DE LIMA, C.G; XIAU, Y.Q; GARDAL, S.J. ; BRATTON, D.L; SCHIEMANN, W.P. “Apoptotic cells, through transforming growth factor- $\beta$ , coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages”. (2006). The Journal of Biological chemistry, **281 (50)**: 38376-38384.
51. FRENCH, L. E & TSCHOPP, J, “Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors” (2003). Cell Death Differ. **10(1)**:117-23.
52. GABLER, C; KALDEN, J.R & LORENZ, M.H. “The putative role of apoptosis modified histones for the induction of autoimmunity in Systemic Lupus Erythematosus” (2003). Biochemical Pharmacology, **66**: 1441-1446.
53. GAJPL, U.S; Kuhn, A; Sheriff, A; Munoz, L.E; Franz, S; Voll, R.E; Kalden, J.R & Herrmann, M. “Clearance of apoptotic cells in human SLE.” (2006). Curr Dir Autoimmun. **9**: 173-187.
54. GENSLER, T.J; Hottel, M.; Zhang, C.; Schlossman, S.; Anderson, P & Utz, P.J. “Monoclonal antibodies derived from Balb/c mice immunized with apoptotic Jurkat T cells recognize known autoantigens” (2001). Journal of Autoimmunity, **16**. 59-69.
55. GERBER JS, MOSSER DM. “Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors.” (2001). J Immunol. **166(11)**:6861-8.

56. GERSHOV D, KIM S, BROTH N, ELKON KB. “C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity.” (2000). J Exp Med. **192(9)**:1353-64. GERSLOV (2000)
57. GILLIGAN HM, BREDY B, BRADY HR, HEBERT MJ, SLAYTER HS, XU Y, RAUCH J, SHIA MA, KOH JS, LEVINE JS “Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies interact with primary granule constituents on the surface of apoptotic neutrophils in the absence of neutrophil priming.” (1996) J Exp Med. **184(6)**:2231-41
58. GREENBERG, ME; SUN, M; ZHANG, R; FEBRARIO, M; SILVERSTEIN, R & HAZEN SL. “ The phagocytosis of apoptotic cells within an organism is a critical terminal physiological process in programmed cell death.” (2006). Journal Experimental of Medicine.**203 (12)**: 2613-2625.
59. GROSS, A.; MCDONNELL, J.M. & KORSMEYER, S. J. (1999). “BCL-2 family members and the mitochondriain apoptosis”. Genes Dev. **13**. 1899-1911.
60. HAMON, Y; BROCCARDO, C; CHAMBENOIT, O; LUCIANI, M.F; TOTI, F; CHASLIN, S; FREYSSINET, J.M; DEVAUX, P.F; MCNEISH, J; MARGUET, D & CHIMINI, G.. “ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and trans bilayer redistribution of phosphatidylserine” (2000). Nat Cell Biology, **2**. 399-406.
61. HANAYAMA, R; TANAKA M, MIWA K, SHINOHARA A, IWAMATSU A, NAGATA S. “Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes”. (2002). Nature. **417(6885)**:182-7.
62. HANSON, W; CHAPMAN, W & WAITS, V. “Immunization of mice with irradiated *Trypanosoma cruzi* growth in cell culture: relation of number of parasites, immunizing injections and riutes of imunization to resistance” (1976). Int. Journal Parasitol, **6**. 341.
63. HART, SP; SMITH JR & DRANSFIELD, I.” Phagocytosis of opsonized apoptotic cells: roles for ‘old-fashioned’ receptors for antibody and complement.” (2004). Clinical Experimental Immunology. **135(2)**: 181-185.

64. HENGARTNER, M.O “The biochemistry of apoptosis”. (2000). Nature, **407**. 770-776.
65. HENSON, P.M; BRATTON, D.L & FADOCKV.A. “The phosphatidylserine receptor a crucial molecular switch? (2001). Nat Rev Mol.Cell Biol., **2**. 627-633.
66. HERKEL, J; MIMRAN, A; EREZ, N; KAM, N; LOHSE, A.W.; MARKER-HERMANN, E;ROTTER, V & COHEN, I.R. “Autoimmunity to p53 protein is a feature of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) related to anti-DNA antibodies.”(2001).Journal of Autoimmunity **17**. 63-69.
67. HERRMANN, M; VOLL, R.E; ZOLLER, O.M.; HAGENHOFER. M.; PONNERB.B. & KALDEN, J.R. “Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte derivad macrophages from patients with systemic lupus erithemathosus”. (1998). Arthritis Rheum, **41**. 1241-1250.
68. HUYNH, M.L.N; FADOCK, V.A & HENSON, P.M. “Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic celld promotes TGF- $\beta$ 1 secretion and the resolution of inflammation” (2002). The Journal of Clinical Investigation, **109**. 41-50.
69. IRMLER M, THOME M, HAHNE M, SCHNEIDER P, HOFMANN K, STEINER V, BODMER JL, SCHROTER M, BURNS K, MATTMANN C, RIMOLDI D, FRENCH LE, TSCHOPP J. “Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP”. (1997). Nature, **388**. 190-5.
70. ISHIMOTO, Y; OHASHI, K; MIZUNO, K & NAKANO, T. “Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas-6”. (2000). Jounal Biochemistry, **127**. 411-417.
71. JULIUS R, SCHULKIND M, SPRINKLE T, RENNERT O. “ Acrodermatitis enteropathica with immune deficiency.” (1973). J Pediatr. **83(6)**:1007-11.
72. JIA, L; PATWARI, Y.; KELSEY, S.M.; SRINIVASULA, S.M.; AGRAWAL, S. G.; ALNEMRI, E.S & NEWLAND, A.C. “Role of Smac in human leukaemic cell apoptosis and proliferation”.(2003) Oncogene, **22**: 1589-1599.
73. JOHNSON, D.E. “Noncaspase proteases in apoptosis.”(2000). Leukemia, **14 (9)**: 1695-1703.

74. JONES EM, COLLEY DG, TOSTES S, LOPES ER, VNENCAK-JONES CL, MCCURLEY TL. "A Trypanosoma cruzi DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy". (1992) Trans Assoc Am Physicians. **105**:182-9.
75. JONES EM, COLLEY DG, TOSTES S, LOPES ER, VNENCAK-JONES CL, MCCURLEY TL. "Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy." (1993). Am J Trop Med Hyg. **48(3)**:348-57
76. KAGAN, V.E. "Öxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine". (2000). FEBS, **477**. 1-7.
77. KERR, J. F.; WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetic"s. (1972). Brazilian Journal of Cancer, **26**. 239-257.
78. KIERSZENBAUM, F. "Chagas´disease and the autoimmunity hypothesis". (1999). Clinical Microbiological Reviews, **12**. 210-223.
79. KIM, S.J; GERSHOV, D; MA, X; BROT, N & ELKON, K.B. "I-PLA<sub>2</sub> Activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphstidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation." (2002). Journal Experimental Medicine. **5**:
80. KIM, S.J; GERSHOV, D; MA, X; BROT, N & ELKON, K.B. "Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses."(2003) Ann N Y Acad Sci., **987**: 68-78.
81. KORB, L.C & AHEARN, J.M. "C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited" (1997)The journal of immunology, **158**. 4525-4528.
82. KOTHAKOTA, S; AZUMA, T; REINHARD, C; KLIPPEL, A; TANG, J; CHU, K; MCGARRY, T.J; KIRSCHNER, M.W; KOTHAS, K; KWIATKOWSKI, D.J & WILLIAMS, L.T. "Caspase 3 generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis"(1997). Scienci, **278**. 294-298.
83. KOTZIN, B.L. "Systemic lupus erythematosus."(1996). Cell. **85(3)**:303-6

84. KOUTOUZOV, S; CABRESPINES, A; AMOURA, Z; CHABRE, H; LOTTON, C & BACH, J.F. "Binding of nucleosomes to a cell surface receptor: redistribution and endocytosis in the presence of lupus antibodies. (1996). Europe Journal Immunology, **26**: 472-486.
85. KOUTOUZOV, S & BACH, J.F. "New clues to systemic lupus" (1997). Immunology, **350**: 11.
86. KRAMMER, P.H. "CD95's deadly mission in the immune system." (2000). Nature. **12;407(6805):789-95**.
87. KROEMER, G. "Mitochondrial control of apoptosis" (2001). Bull Acad Natl Med. **185(6):1135-42**.
88. LAEMMLI, e. "Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4."(1970). Nature. **227**: 680-685.
89. LEON. J.S & ENGMAN, D.M. "Autoimmunity in Chagas heart disease"(2001). International Journal for Parasitology, **31**: 555-561.
90. LEVIN MJ. "In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite."(1996). Parasitol Today.**12(11):415-6**.
91. LEVINE, J.S; KOH, J.S; SUBANG, R. & RAUCH, J. "Apoptotic cells as immunogen and antigen in the antiphospholipid syndrome" (1999).Experimental and Molecular Pathology, **66**: 82-98.
92. LEVINE, J.S & KOH, J.S. "The role of apoptosis in autoimmunity: Immunogen, antigen, and accelerant (1999).Seminars Nephrology, **19**: 34-47.
93. LEVINE JS, SUBANG R, NASR SH, FOURNIER S, LAJOIE G, WITHER J, RAUCH J. "Immunization with an apoptotic cell-binding protein recapitulates the nephritis and sequential autoantibody emergence of systemic lupus erythematosus."(2006). J Immunol. **1;177(9): 6504-16**.

94. LICHT, R; DIEKER, J.W.C; JOBS, C.W.M; TAX, W.J.M & BERDEN, J.H.M. "Decreased phagocytosis of apoptotic cells in diseased SLE mice" (2004). Journal of Autoimmunity, **22**: 139-145.
95. LOPES, M.F; VEIGA, V.F; SANTOS, A.R; FONSRCA, M.E.F & DOS REIS, G.A. "Activation-induced CD4<sup>+</sup>T cell death by apoptosis in Experimental Chagas Disease" (1995). The Journal of Immunology, **154**. 744-752.
96. LOPES MF, NUNES MP, HENRIQUES-PONS A, GIESE N, MORSE HC 3RD, DAVIDSON WF, ARAUJO-JORGE TC, DOSREIS GA. "Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response" (1999). Europe Journal Immunology, **29**. 81-89.
97. LOPES, M.F & DOS REIS, G.A. "Experimental Chagas disease: Phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasites growth" (2000). Apoptosis, **5**. 221-224.
98. LOPES, M.F; FREIRE-DE-LIMA, C.G & DOS REIS, G.A. "The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows". (2000). Immunology Today, **21**. 489-494.
99. LORENZ, H.M; HERRMANN, M; WINKLER, T.; GAJPL, U. & KALDEN, J.R. "Role of apoptosis in autoimmunity" (2000). Apoptosis, **5** (5): 443-449.
100. LUCAS, M; STUART LM; ZHANG, A; HODIVALA-DILKI, K; FEBRAIO, M; SILVERSTEIN, R; SAVILL, J & LACY-HULBERT, A. "Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses" (2006). Journal of Immunology. **177(6)**: 4047-4054.
101. MANCINI, M; NICHOLSON, D.W; ROY, S; THORNBERRY, N.A; PETERSON, E.P; CASCIOLA-ROSEN, L & ROSEN, A. "The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: Implications for apoptotic signaling." (1998). The Journal of Cell Biology, **140**. 1485-1495.
102. MARTIN, S. J. & GREEN, D. R. "Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts?"(1995). Cell, **82**. 349-352
103. MARTINS, L.M.; FACCARINO, I; TENEV, T.; GSCHMEISSNER, S.; TOTTY, N.F.; LEMOINE, N. R.; SAVOPONLOS, J.; GRAY, C.W.; GREASY, C.L.; DINGWALL, C. &

DOVNWARD, J. "The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif" (2002). Journal Biology Chem, **277**: 439-444.

104.MEAGHER, L.C; SAVILL, J.S; BAKER, A; FULLER R.W & HASLETT, C. "Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophages release of tromboxane B2" (1992). Journal Leukocyte Biological, **52**. 269-273.

105.MELCHER, A; TODRYK, S; HARDWICK, N; FORD, M; JACOBSON, M & VILE, R.G. "Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death induction of heat shock protein expression"(1998). Nature Medicine, **4**. 581-587.

106.MEVORACH, D; ZHOU J.L; SONG, X & ELKON, K.B. "Sistemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production".(1998a). Journal Experimental Medicine **188**. 387-392

107.MEVORACH, D; MASCARENHAS, J.O; GERSHOV, D & ELKON, K.B. "Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages" (1998b) Journal Experimental Medicine, **188**. 2313-2320.

108.MEVORACH, D. "Opsonization of Apoptotic Cells: Implications of Uptake and Autoimmunity" (2000). Annals of the New York Academy of Sciences, **926**: 226-235.

109. MORGAN, B.P & WALPORT, M.J "Complement deficiency and disease". (1991). Immunol Today, **12(9)**:301-6.

110.NAGATA, S. "Apoptosis by Death Factor" (1997). Cell, **88**. 355-365

111.NAGATA, S."Apoptotic DNA fragmentation" (2000).Exp. Cell Res. **256**.12-18.

112. NAUTA, A.J.G.; CASTELLANO, W.; XU, A. M.; WOLTMAN, M.C.; DAHA, C.; VAN KOOTEN & ROSS, A. "Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells."(2004). J. Immunol. **173**: 3044-3050.

113.NICHOLSON, N. D. & THORNBERRY, N. A. "Caspases: killer proteases" (1997). Trends Biochemical Scienci, **257**. 299-309.



114. NICHOLS KE, HAINES K, MYUNG PS, NEWBROUGH S, MYERS E, JUMAA H, SHEDLOCK DJ, SHEN H, KORETZKY GA. "Macrophage activation and Fcγ receptor-mediated signaling do not require expression of the SLP-76 and SLP-65 adaptors."(2004). J Leukoc Biol.**75(3):**541-52.

115. NUNES, M.P; ANDRADE, R.M; LOPES, M.F& DOS REIS, G.A. "Activation-induced T cell death exacerbates Trypanosoma cruzi replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts." (1998). J Immunol. **160(3):**1313-9.

116. OGDEN, C.A; DE CATHELINEU, A; HOFFMAN, P.R; BRATTON, D.L; GHEBRE HIWET, B; FADOCK, V.A & HENSON, P.M. " C1q and Mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells" (2001). Journal Experimental Medicine.

117. OGDEN C.A; KOWALEWSKI, R; PENG, Y; MONTENEGRO, V & ELKON, K.B: "IgM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo" (2005). Autoimmunity, **38(4):** 259-264.

118. PASCAL MEIER; ANDREW FINCH & GERARD EVAN. "Apoptosis in development"(2000). Nature, **407**. 796-801.

119. PENG. Y; KOWALEWSKI, R; KIM. S & ELKON K.B. "The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells."(2005). Molecular Immunology, **42(7)**. 781-787.

120. PEREIRA-DE-GODOY, MR; CACAO, JC; PEREIRE-DE-GODOY, J.M; BRANDAO, A.C & SOUZA, D.S.R. " Chagas disease and anticardiolipin antibodies in older adults" (2005). Arch. Gerontol. Geriatr.**41:** 235-238.

121. PETTERSEN, R.D. "CD47 and death signaling in the immune system"(2000). Apoptosis, **5:** 299-306.

122. PETRY K, VAN VOORHIS WC. "Antigens of Trypanosoma cruzi that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease." (1991). Res Immunol. **142(2):**151-6

123. PHILCHENKOV, A. "Caspases: potential targets for regulating cell death"( 2004). Journal Cell Molecular. Medicine. **8 (4):** 432-444.

124. PLATT N & GORDON, S.. “ Class A scavenger receptors and the phagocytosis of apoptotic cells” (1999). Immunology Letters, **65**. 15-19.
125. PLATT N & GORDON, S. “ Is the classA macrophage scavenger receptor multifunctional- The mouse´s tale” (2001). Journal Clinical Invest **108**. 649-654.
126. PITTONI, V & VALESINI, G. “The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity”(2002). Autoimmunity Reviews, **1**: 154-161.
127. QUARTIER, P.; POTTER, P.K; EHRENSTEIN, M.R; WALPORT, M.J & BOTTO, M. “Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro”(2005). Eur J. Immunol. **35(1)**: 252-260.
128. RADIC MZ, SHAH K, ZHANG W, LU Q, LEMKE G, HILLIARD GM. “Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein P2 is an autoantibody target in mice deficient for Mer, Axl, and Tyro3 receptor tyrosine kinases.”(2006). J Immunol. **176(1)**:68-74.
129. RAMENGGHI U, BONISSONI S, MIGLIARETTI G, DEFRANCO S, BOTTAREL F, GAMBARUTO C, DIFRANCO D, PRIORI R, CONTI F, DIANZANI I, VALESINI G, MERLETTI F, DIANZANI U. “Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer.”(2000). Blood. **95(10)**:3176-82.
130. RAVETCH, J.V & BOLLAND, S. “IgG Fc Receptors”(2001). Annu. Rev. Immunol. **19**: 275-290.
131. REINHARD E. VOLL.; MARTIN, H.; EDITH, A. ROTH; Christian Stach & Joachim, R. Kalden. “Immunosuppressive effects of apoptotic cell”. (1997). Nature, **390**. 350-351.
132. RIGOTTI, A; ACTON, S.L & KRIEGER, M. “ The class B scavenger receptors SR-B1 and CD36 are receptors for anionic phospholipids.”. (1995). Journal Biological and Chemistry, **270**. 16221-16224.
133. SAELENS, X<sup>1</sup>; FESTJENS, N<sup>1</sup>; VANDE WALLE, L; VAN GURP<sup>1</sup>, M; VAN LOO,G & VANDENABEELE, P. ” Toxic proteins released from mitochondria in cell death”. (2004). Oncogene. **23(16)**:2861-74.

134. SAVILL, J.; HOGG, N; REN, Y & HASLET, C. “Thrombospondin cooperates with CD36 and vitronectin receptor in macrophages recognition of neutrophils undergoing apoptosis. (1992). Journal Clinical Investigator, **90**. 1513-1522.
135. SAVILL, J. & FADOCK, V. “Corpse clearance defines the meaning of cell death” (2000). Nature, **407**. 784-788.
136. SAVILL, J “A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses”. (2002) Nat Rev Immunol. **2(12)**:965-75
137. SCOTT, R.S; MACMAHON, E.J; POP, S.M; REAP, E.A; CARICCHIO, E; COHEN, P.L; EARP, H.S & MATSUSHIMA, G.K. “Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER”. (2001). Nature, **411**. 207-211.
138. SHARMA, K; WANG, R.; ZHANG, L.Y; YIN, D.L; LUO, X.Y; SOLOMON, J.C; JIANG, R.F; MARKOS, K; DAVIDSON, W; SCOTT, D.W & SHI, Y.F. “Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand”(2000). Pharmacology & Therapeutics, **88**: 333-347.
139. SIMS, P.J & WIEDMER, T. “Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling”. (2001). Tromb. Haemost, **86**. 266-275.
140. SILVA EM, GUILLERMO LV, RIBEIRO-GOMES FL, DE MEIS J, NUNES MP, SENRA JF, SOARES MB, DOSREIS GA, LOPES MF. “Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to Trypanosoma cruzi infection.” (2007). Eur J Immunol. **37(3)**:738-46.
141. SLEE, E.A; ADRAIN, C & MARTIN S.J “Serial Killers: ordering caspase activation events in apoptosis”(1999). Cell Death Differ. **6**. 1067-1074.
142. SOARES, M.B.P; PONTES –DE-CARVALHO, L & RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. “The pathogenesis of Chagas disease: When autoimmune and parasite specific immune responses meet”(2001). Annual Academic Brazilian Cientific. **73 (4)**: 547-559.
143. STENNICKE, H. R.; JURGENSMEIER, J. M.; SHIN, H.; DEVERAUX, A.; WOLF, B. B.; YANG, X.; ZHOU, Q.; ELLERBY, H.M.; ELLERBY, L. M.; BREDESEN, D.; GREEN, D. R.; REED, J. C.; FROELICH, C. J. & SALVESEN, G. S. “Pro-caspase 3 is a major physiologic target of caspase-8” (1998). Journal Biological Chemistry, **273**. 27084-27090.

144. STERN, M; SAVILL, J & HASLETT, C. "Human monocyte-derived macrophages phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by  $\alpha\beta$ 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response" (1996). American Journal Pathology, **149**. 911-921.
145. SUSIN, S.A; LORENZO, H.K; ZAMZAMI, N; MARZO, I; SNOW, B.E; BROTHERS, G.M; MANGION, J; JACOTOT, E; COSTANTINE, P; LOEFFER, M; LAROCLETTE, N; GOODLETT, D.R; AEBERSOLD, R; SIDEROVSKI, D.P; PENNINGER, J.M & KROEMER, G. "Molecular characterixation of mitochondrial apoptosis-inducing factor"(1999). Nature, **397**. 441-446.
146. SZARFMAN, A; COSSIO, P.M; LAGUENS, R.P; SEGAL, A; DE LA VEGA, M.T; ARANA, R.M & SCHMUNIS, G.A. "Immunological studies in Rockland mice infected with *T. cruzi* development of antinuclear antibodies." (1975). Biomedicine, **22**: 489-495.
147. TAKAHASHI, A; ALNEMRI, E.S; LAZEBNIK, Y.A; FERNANDES-ALNEMRI, T; LITWACK, G; MOIR, R.D; GOLDMAN, R.D; POIER, G.C; KAUFMANN, S.H & EARNSHAW, W.C. "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition proper ties are active in apoptosis" (1996). Proceedins Natl. Acad Science USA **93**. 8395-8400.
148. TAKAI, T. "Roles of Fc Receptors in Autoimmunity"(2002). Nature Immunol. **2**: 580-592.
149. TALVANI, A; RIBEIRO, C.S; ALIBERTI, J.C; MICHAILOWSKY, V; SANTOS, P,V; MURTA, S.M; ROMANHA, A.J; ALMEIDA, I.C; FARBER, J; LANNES-VIEIRA, J; SILVA, J.S & GAZZINELLI, R.T. "Kinetics of cytokines gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous INF-gama as important determinants of chemokine mRNA expression during infections with *Trypanosoma cruzi*". (2000). Microbs Infection, **2**. 851-866.
150. TAPINOS, N.I; POLIHRONIS, M; TZIOUFAS, A.G & MOUTSOPOLOS, H.M. " Sjogren`s syndrome. Autoimmunity epithelitis." (1999). Adv. Exp. Med. Biol, **455**. 127-134.
151. TARLETON, R.L & ZHANG, L. " Chagas disease etiology: autoimmunityor parasite persistence" (1999). Parasitology Today, **15**. 94-99.

152. TARLETON, R.L. “ Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease” (2001). International Journal for Parasitology, **31**. 550-554.
153. TAYLOR, P.R; CARUGATI, A; FADOCK, V.A; COOK, H.T; ANDREWS, M; CARRLL, M.C; SAVILL. J.S; HENSON, P.M; BOTTO, M & WALPORT, M.J. “ A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo” (2000).Journal Experimental Medicine, **192**. 359-366.
154. TUOMINEN, A; Miller, Y.I; Hansen, L.F; Kesaniemi, Y.A; Witztum J.L & Horkko, S. “ A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions” (2006). Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**26(9)**: 2096-2102.
155. TYURINA, Y.Y. “ Phospholipid signaling in apoptosis: peroxidation and externalization of phosphatidylserine” (2000). Toxicology, **148**. 93-101.
156. UPPINGTON H, MENAGER N, BOROSS P, WOOD J, SHEPPARD M, VERBEEK S, MASTROENI P. “Effect of immune serum and role of individual Fcγ receptors on the intracellular distribution and survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium in murine macrophages.”(2006). Immunology. **119(2)**:147-58.
157. VAGO AR, MACEDO AM, OLIVEIRA RP, ANDRADE LO, CHIARI E, GALVAO LM, REIS D, PEREIRA ME, SIMPSON AJ, TOSTES S, PENA SD. “Kinetoplast DNA signatures of Trypanosoma cruzi strains obtained directly from infected tissues.” (1996). Am J Pathol. **149(6)**:2153-9.
158. VERHAGEN, A. M.; EKERT, P G.; PAKUSCH, M; SILKE, J; CONNOLLY, L. M.; REID, G. E.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J. & VAUX ,D. L. “Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins” . (2000). Cell, **102**. 43-53.
159. WETZEL, E.B & GREEN, D.R. “Caspases Induce Cytochrome c Release from Mitochondria by Activating Cytosolic Factors”(1999). The Journal of Biological Chemistry, **274 (25)**: 17484-17490.
160. WU, Y.C & Horvitz, H.R. “ The C. elegans cellcorpse engulfment gene ced-7 encodes a protein similar to ABC transporters” (1998). Cell, **93**. 951-960.
161. YANG, X.; CHANG, H.Y & BALTIMORE, D. (1998) “Autoproteolytic Activation of Pro-Caspases by Oligomerization”. Molecular Cell, **1**. 319-325.

162. YOUNG JD, KO SS, COHN ZA. "The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis."(1984). Proc Natl Acad Sci U S A. **81(17)**:5430-4.
163. YORK, L.A.; GOLDBERG, A.L.; MO, X.Y. & ROCK, K.L. (1999)"Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation." Immunol. Rev. **172**: 49-66.
164. ZHOU, H.; HENZEL, W.J.; LIU, X.; LUTSCHG, A. & WANG, X. "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c dependent activation of caspase 3" .(1997). Cell, **90**. 405-413.
165. ZHOU, P.; CHOU, J.; OLEA, R. S.; YUAN, J. & WAGNER, G. "Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase 9 CARD; A structural basis for specific adaptor/caspase interaction"(1999). Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **96**. 11265-11270.
166. ZUÑIGA, E., MOTRA, C.C.; MONTES, C.L.; YAGITA, H & GRUPPI, A. "*Trypanosoma cruzi* infection selectively renders parasite specific IgG<sup>+</sup> B lymphocytes susceptible to Fas/Fas ligand-mediated fratricide" (2002). Journal of Immunology. **168**: 3965-3973.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)