

BRUNO GALVÃO FILHO

Dissertação de Mestrado

**Caracterização funcional dos linfócitos B1a
na imunidade inata durante a infecção por
*Trypanosoma cruzi***

Belo Horizonte-MG
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Caracterização funcional dos linfócitos B1a
na imunidade inata durante a infecção por
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Departamento
de Bioquímica e Imunologia como requisito
para a obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Imunologia.

Aluno: Bruno Galvão Filho

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Co-orientadora: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Belo Horizonte-MG

Agosto/2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli quem me ofereceu suporte e orientação diferencial e contribuiu largamente no meu crescimento intelectual.

A minha co-orientadora Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli quem teve grande influência no meu aprimoramento técnico e científico.

A Prof. Ana Maria Caetano pela sua disponibilidade e seu papel intelectual neste trabalho

Ao aluno MS. Rafael Pires pela disponibilidade e ajuda.

Ao Dr. Alexandre Machado por confiar em mim e me inserir no laboratório.

Ao Ms. Rafael Polidoro pelo exemplo e competência, pela ajuda direta, opinião e participação na correção da dissertação.

A Dra. Luara Isabela e Dra. Caroline Furtado que foram fundamentais no meu aprendizado durante toda minha estadia no laboratório

Aos amigos Ms. Marco Ataíde, Ms. Pedro Augusto e Dr. Warrison Atanásio pelas discussões no laboratório que tanto contribuíram para meu desenvolvimento crítico.

A equipe técnica do LAIM/FIOCRUZ-MG e IMPAR/UFMG por facilitar meu trabalho sempre, especialmente a Clécia e a Maria Helena.

A Eneida e as secretárias Lorena, Iara e Marina por resolverem toda burocracia que poderia tornar meu trabalho mais lento.

Um agradecimento especial a minha mãe, Dalva, por toda a dedicação e paciência doadas a mim. Pelo exemplo de respeito e honestidade.

As minhas irmãs Jaqueline e Renata e meu sobrinho Kaíque, os quais me apoiaram durante os momentos mais difíceis e me motivaram a continuar.

A minha esposa, Aracele, pelo seu apoio incondicional e por me dar um filho maravilhoso, Victor, que tem sido um grande estímulo para o meu crescimento profissional.

A todos que colaboraram para esse trabalho direta ou indiretamente, mas não foram citados aqui. Obrigado pelo apoio!

EPIGRAFE

Nenhum homem poderá revelar-vos nada senão o que já está meio adormecido na aurora do vosso entendimento.

Khalil Gibran

RESUMO

A Doença de Chagas atinge aproximadamente 8 milhões de indivíduos na América Latina e é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Existem muitos estudos acerca da imunidade inata e adquirida durante a infecção pelo parasito em modelo murino, dos quais alguns demonstram a importância da produção de anticorpos para combater a infecção. Todavia, além dos anticorpos, as células B são capazes de produzir citocinas e seu papel neste contexto é muito pouco explorado em doenças causadas por protozoários. Neste trabalho foi demonstrado que as células B1, predominantes na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6, são poderosas produtoras de IL-10 quando ativadas por oligonucleotídeos CpGs derivados de *Trypanosoma cruzi* (*in vitro*). Por outro lado baixos níveis de TNF- α e IL-6 são produzidos por essas células. Além disso, a infecção de camundongos com a cepa CL de *T. cruzi* ou a estimulação *in vivo* com CpG B344 derivado do parasito ativa as células B1 da cavidade peritoneal levando ao aumento da expressão de moléculas coestimulatórias. As subpopulações de células B1, B1a e B1b, foram separadamente avaliadas quanto a sua capacidade de produzir citocinas após estimuladas com moléculas CpG. A célula B1a é predominante na cavidade peritoneal e mostrou ser a principal fonte de IL-10 comparada as células B1b e B2. Concluímos que a célula B1a é uma fonte rápida de IL-10 na infecção por *Trypanosoma cruzi*, portanto devem ter um importante papel regulatório neste modelo antes da ativação de células T produtoras de IL-10 e podem contribuir com parte dessa produção após a ativação das células T no baço.

Palavras chave: Trypanosoma cruzi, Células B, Citocinas, Regulação

ABSTRACT

Chagas disease affects approximately 8 million people in Latin America. There are many studies about Acquired and Innate Immunity against the parasite in a murine model, some of which demonstrate the importance of antibody production against the parasite. However, in addition to antibodies, B cells are capable of producing cytokines and their role in this context is largely unexplored in diseases caused by protozoa. In this work it was shown that cells B1, prevailing into peritoneal cavity of C57BL/6 mice are powerful producers of IL-10 when activated by oligonucleotide CpGs derived from *Trypanosoma cruzi* (*in vitro*). However B1 cells produce low levels of TNF- α and IL-6. Furthermore, we demonstrated that infection of mice with CL strain of *T. cruzi* or *in vivo* stimulation with CpG B344 derived from parasite activates B1 cells from peritoneal cavity leading to an increase in the expression of costimulatory molecules. Subsequently, we evaluated subpopulations of cells B1 (B1a and B1b) and although both cells were sensitive to stimulation with agonists of TLRs, we conclude that B1a cells are the major producers of IL-10 in peritoneal cavity, mainly because they are prevailing in number when compared to cells B1b. In this work, we conclude that B1 cells are the first cells to produce IL-10 in *Trypanosoma cruzi* infection, therefore have an important regulatory role in this model before the activation of T cells producing IL-10 and may contribute to part of this production after activation of T cells in the spleen.

Key words: Trypanosoma cruzi, B cells, Cytokines, Regulation

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição geográfica da Doença de Chagas	14
Figura 2: O ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	16
Figura 3: Detecção do parasito por componentes da imunidade inata.....	18
Tabela 1: Fenótipos descritos na literatura para diferentes subpopulações de células B.....	20
Tabela 2: Marcadores de superfície das subpopulações de células B.	22
Figura 4: Populações celulares da cavidade peritoneal	31
Figura 5: Perfil das subpopulações de células B da cavidade peritoneal.	32
Figura 6: Infecção com <i>T. cruzi</i> causa mudanças no número total de B1 da cavidade peritoneal.	33
Figura 7: Expressão de moléculas coestimulatórias por células B.....	34
Figura 8: Purificação de células por citometria de fluxo.	35
Figura 9: Produção de anticorpos após estímulo <i>in vitro</i>.	36
Figura 10: Frequência de células B produtoras de citocinas.....	37
Figura 11: Quantificação da produção de citocinas por células B	38
Figura 12: Produção de citocinas por subpopulações de células B1	39
Figura 13: Avaliação de células B produtoras de IL-10 no baço.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Células apresentadoras de antígenos
APRIL: Ligante indutor de proliferação
B10: Células B produtoras de IL-10
BCR: Receptor de antígeno dos linfócitos B
BLyS (BAFF): Proteína estimuladora de Linfócito B
Bregs: Células B reguladoras
CD: *Cluster of differentiation*
CpG: Citosina-fosfato-Guanina
EAE: Encefalomielite alérgica experimental
FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorter*
FO: Células B Foliculares
GPI : Glicosilfosfatidilinositol
GIPs : Glicoinositol-fosfolípides
IFN γ : Interferon gama
i.p: Intraperitoneal
Ig: Imunoglobulina
IgA: Imunoglobulina de cadeia α
IgG: Imunoglobulina de cadeia γ
IgE: Imunoglobulina de cadeia ϵ
IgM: Imunoglobulina de cadeia μ
IgD: Imunoglobulina de cadeia δ
IL: Interleucina
LIT: *Liver infusion tryptose*
MD-2: Proteína ligante de TLR4
MZB: Células B da zona marginal do baço
MyD88: Gene de resposta a diferenciação mielóide primária
ODN: Oligonucleotídeos imunoestimulatórios
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
PRR: Receptor reconhecedor de padrões
RBCs: Células vermelhas
SLE: Lúpus eritromatoso sistêmico

TD: T dependentes

TI: T independentes

TLRs: Receptores do Tipo Toll

TMB: Tetrametilbenzidina

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

mg : Miligrama

μ g : Micrograma

mL : Mililitro

μ L : Microlitro

mM : Milimolar

1. INTRODUÇÃO.	12
1.1 Epidemiologia da Doença de Chagas.	13
1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
1.3 Papel dos TLRs na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.4 Diferentes fenótipos das subpopulações de células B	19
1.5 Marcadores de superfície das células B	21
1.6 Produção de citocinas por células B.	23
2. OBJETIVOS.	24
2.1 Objetivo geral.	24
2.2 Objetivos específicos.	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	25
3.1 Camundongos.	25
3.2 Caracterização de células por citometria de fluxo	25
3.3 Purificação de células.	26
3.4 Manutenção da cepa de <i>T.cruzi</i>	26
3.5 Estímulo <i>in vitro</i> com CpGs.	26
3.6 Infecção de camundongos	27
3.7 Detecção e quantificação de citocinas por CBA.....	27
3.8 Detecção e quantificação de citocinas por ELISA.....	28
3.9 Detecção de citocinas pela metodologia de marcação intracelular	28
3.10 Detecção de anticorpos pela metodologia ELISA.....	29
3.11 Cultivo de esplenócitos.....	29
3.12 Plotagem de dados e estatística.....	30
4. RESULTADOS.	31
4.1 Caracterização das populações celulares da cavidade peritoneal	31
4.2 Caracterização das subpopulações de células B da cavidade peritoneal.....	32
4.3 A infecção com <i>Trypanosoma cruzi</i> leva ao aumento imediato da população de células B1 na cavidade peritoneal	33
4.4 Estímulo com CpGs derivados de <i>T.cruzi</i> leva ao aumento da expressão de moléculas coestimulatórias em células B1 <i>in vivo</i>	34
4.5 Os linfócitos B purificados secretam IgM após estímulo com CpGs de <i>T.cruzi</i>	35

4.6 Estímulo de células B purificadas com CpGs de <i>T.cruzi</i> indica capacidade regulatória de células B1	36
4.7 As células B1a são as principais produtoras de IL-10 da cavidade peritoneal	38
4.8 Produção de IL-10 por células B no baço indicam seu papel regulatório mais tardio na fase aguda da infecção	40
5. DISCUSSÃO.....	42
5.1 Ativação de células B via TLRs	42
5.2 TLRs e ativação de células B1 na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
5.3 Citocinas pró-inflamatórias e seus efeitos em células B.	43
5.4 Papel da IL-10 na infecção por protozoários.	44
5.5 Relação entre os linfócitos B e outras células do sistema imune.....	45
5.6 Caráter multifuncional dos linfócitos B.....	47
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas é uma doença causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* pertencente à família *Tripanosomatidae*. Essa família é formada por parasitos obrigatórios e parte do ciclo digenético é encontrado predominantemente em insetos. O *Trypanosoma cruzi* possui diferentes estágios de desenvolvimento, alguns capazes de infectar células de uma variedade de vertebrados (Morel and Lazdins 2003). Essa parasitose afeta cerca de 8 milhões de pessoas em toda a América Latina (WHO 2010).

Desde a descoberta do *Trypanosoma cruzi* e a caracterização da Doença de Chagas, muito tem sido estudado sobre a infecção causada pelo parasito e como ele é reconhecido pelo sistema imune inato (Kayama and Takeda 2010). Todavia os mecanismos imunológicos durante a infecção são extremamente complexos, envolvendo simultaneamente vários tipos celulares que precisam ser estudados cuidadosamente (Dutra, Martins-Filho et al. 1996; Majumder and Kierszenbaum 1996; Kayama and Takeda 2010; Bermejo, Amezcua Vesely et al. 2011). As células B são sabidamente importantes no controle da Doença de Chagas, cuja produção de anticorpos foi explorada considerando-se vários aspectos da infecção (Yoshida, Araya et al. 1993; Leguizamon, Campetella et al. 1994; Magez, Schwegmann et al. 2008). No entanto, existem poucas descrições sobre o papel inflamatório e regulatório das células B durante a infecção por *T. cruzi*.

Alguns modelos vacinais também têm sido propostos associando componentes do parasito em modelos modernos de vacinas, alguns usando vetores vacinais carreadores de proteínas do parasito (Garg and Tarleton 2002; Barbosa, Filho et al. 2013). Os modelos vacinais geralmente apontam o papel de células T e a produção de anticorpos específicos contra proteínas provenientes do parasito (Gupta, Wan et al. 2013; Nogueira, Nogueira et al. 2013). É importante ressaltar que uma resposta imune eficiente e duradoura de uma vacina, precisa antes elicitar uma poderosa, mas equilibrada reação mediada por receptores da imunidade inata. Nesse aspecto, nosso laboratório demonstrou que CpGs derivados de *Trypanosoma cruzi* funcionam como excelentes adjuvantes quando associados a uma proteína expressa em tumores (Junqueira, Guerrero et al. 2012).

Devido a importante atividade estimulatória dos CpGs derivados de *T. cruzi* e a sabida expressão de TLR9 pelas células B, este trabalho teve a finalidade de

demonstrar a atividade estimulatória desses oligonucleotídeos nos linfócitos B e suas conseqüências.

1.1 Epidemiologia da Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose transmitida ao homem pelas fezes de triatomíneos infectados com o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Na natureza, mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes Ordens, foram reportadas como hospedeiros do *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido por hemipteras da família Reduviidae como *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*.

São conhecidos dois ciclos distintos do parasito: o ciclo silvestre, associado à hemipteras e vertebrados selvagens; e o ciclo doméstico, que envolve os humanos e animais domésticos. Esses ciclos são conectados por vertebrados como ratos e gambás infectados, além de hemipteras que migram para o ambiente comum aos humanos como resultado da destruição de florestas (Coura and Dias 2009).

Os hemipteras infectados com *T. cruzi* são encontrados principalmente nos países do Continente Americano, sendo a América Latina a principal área afetada no mundo pela Doença de Chagas (Figura 1). Neste Continente, cerca de 8 milhões de pessoas devem estar infectadas com o parasito (WHO 2013).

Diferentes modos de transmissão já foram relatados: infecção oral, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Moncayo and Silveira 2009). Foi estimado que aproximadamente 700.000 pessoas infectadas pelo *T. cruzi* vivem fora da América Latina, o que torna as transfusões sanguíneas e os transplantes de órgãos fatores relevantes na disseminação do parasito em países não endêmicos.

Dois sintomas podem ajudar no diagnóstico da fase aguda da doença: o sinal de Romaña, uma adenopatia periauricular; e o Chagoma, infecção provocada no local da picada do barbeiro. Entretanto, estes sinais não são sempre evidentes, o que torna o diagnóstico mais difícil (Kierszenbaum, 2007; Biolo, Ribeiro et. al., 2010). A detecção dos parasitos no sangue ainda é uma das melhores opções de diagnóstico, já que o teste sorológico só é eficaz na fase crônica da doença. Além disso os medicamentos disponíveis (Nifurtimox e Benzonidazol) só agem na fase aguda da doença. Todavia alguns estudos indicam a possibilidade desses medicamentos serem eficazes em todas as fases da doença quando combinados (Tarleton,

Reithinger et al., 2007; OMS, 2009).

Os sintomas mais comuns durante a fase crônica da Doença de Chagas incluem: arritmias provocadas por danos severos no miocárdio, aneurisma ventricular apical e uma falha congestiva no coração. Outros sintomas são mais comuns em pacientes infectados na região central do Brasil, como o megaesôfago e o megacólon (Andrade, Andrade et al., 1994; Kierszenbaum, 2007).

Não existem vacinas disponíveis para essa doença, portanto a profilaxia se baseia principalmente no uso de inseticidas contra os barbeiros, melhoramento das condições de moradia, boa higiene no preparo de alimentos, melhor controle de transfusões sanguíneas e transplantes (WHO 2013).



Figura 1 – Distribuição geográfica da Doença de Chagas: A doença de Chagas atinge principalmente os países da América Latina (em azul), sendo um importante problema de saúde pública (WHO 2013).

1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas. O parasito possui um ciclo de vida complexo, pois seu ciclo de vida inclui dois hospedeiros, um invertebrado e o outro vertebrado, além de apresentar formas variadas em cada um dos hospedeiros (Figura 2). O ciclo inicia-se no momento em que uma espécie de triatomíneo, por exemplo, *Triatoma infestans*, vulgarmente conhecido como barbeiro, suga o sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, que contém parasitos livres na forma tripomastigota. O *T. cruzi* ingerido, na cavidade gástrica do barbeiro, se diferencia na forma epimastigota e durante este estágio é capaz de se replicar por repartição binária. Em seguida, os parasitos passam por um processo de metaciclogênese na região posterior do intestino do inseto, que culmina em sua forma tripomastigota metacíclica. Esta última pode infectar o hospedeiro vertebrado pelas fezes do inseto que entram em contato com o orifício provocado pela picada do barbeiro, transmitindo os tripomastigotas metacíclicos. Neste processo, centenas de parasitos são inoculados e rapidamente iniciam o processo de infecção das células do hospedeiro. Dentro da célula, o parasito se diferencia em amastigota, forma capaz de se replicar no hospedeiro vertebrado e que após multiplicar-se se diferenciam em tripomastigotas, destroem a célula e podem então infectar outras células ou reiniciar o ciclo (Chagas, 1909).

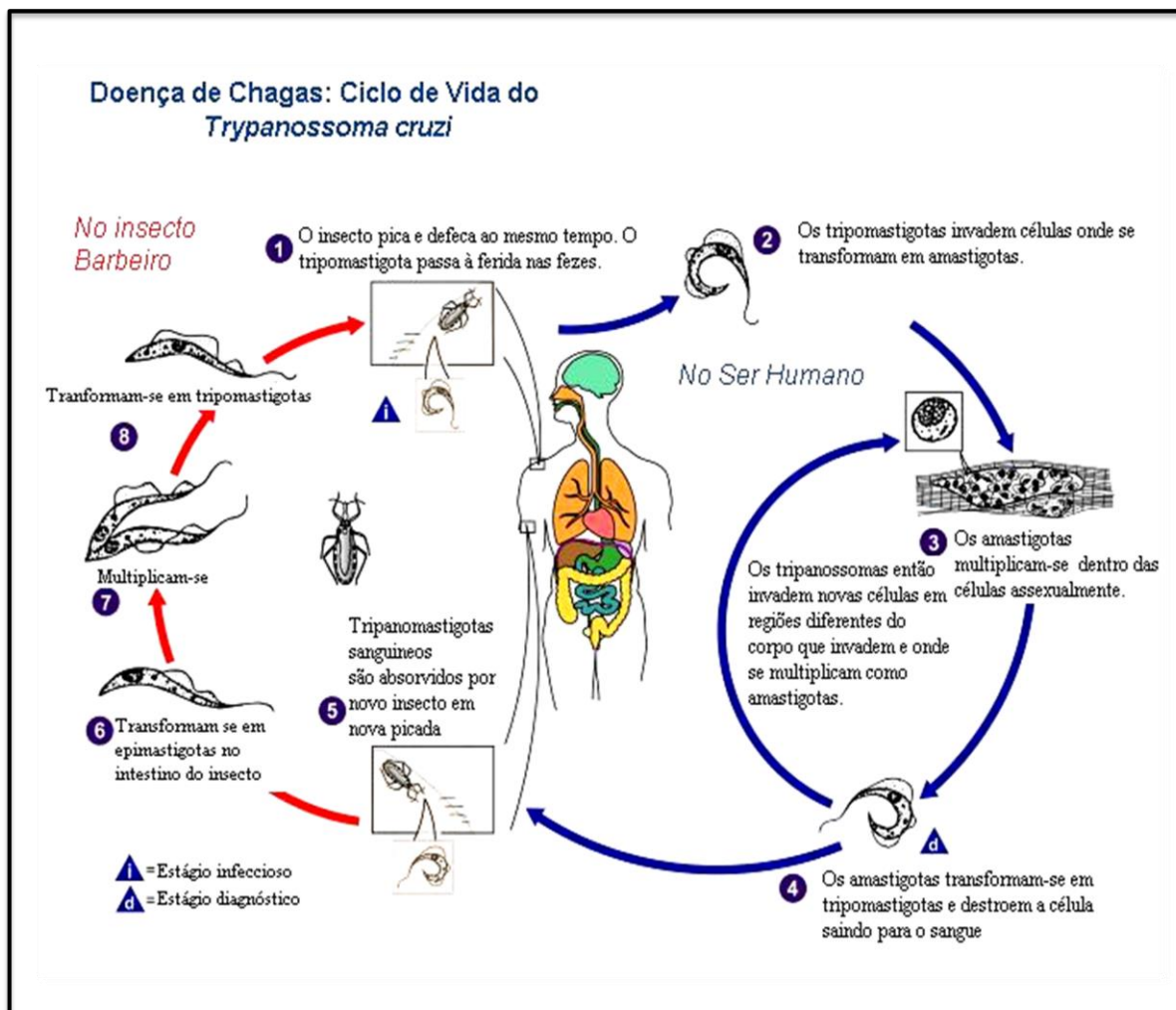


Figura 2 – O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O inseto infectado transmite o parasito através da picada para o vertebrado (1) e esses parasitos invadem células diferenciando-se em amastigotas (2). Estes se multiplicam dentro das células (3), mas depois diferenciam-se em tripomastigotas e destroem as células (4). Uma vez livres no sangue, eles podem infectar novos insetos através da sucção durante nova picada (5) e transformarem-se em epimastigotas no intestino do insecto (6), que são capazes de se multiplicar (7) e no intestino posterior sofrer a diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (8), estes capazes de reiniciar o ciclo (Chagas, 1909).

1.3 Papel dos TLRs na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Os TLRs são os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) mais bem estudados no meio científico. Eles são receptores cognatos da imunidade inata que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) derivados da parede celular de bactérias, ácidos nucleicos de vírus e outros componentes

presentes em microrganismos (Aderem and Ulevitch 2000; Takeda, Kaisho et al. 2003). Com exceção do TLR3, a sinalização via TLRs é dependente da molécula adaptadora MyD88 para levar a ativação de fatores de transcrição e culminar na produção de citocinas pró-inflamatórias (O'Neill and Bowie 2007).

Muitos estudos identificaram âncoras de Glicosilfosfatidilinositol (GPI), como moléculas capazes de ativar células de origem linfóide e mielóide (Almeida and Gazzinelli 2001). O TLR2 foi identificado como o principal receptor das âncoras de GPI em macrófagos (Campos, Almeida et al. 2001) e funciona formando um heterodímero com TLR6 (Ropert, Closel et al. 2003; Gazzinelli and Denkers 2006). Âncoras de GPI livres são também encontradas na membrana plasmática do *Trypanosoma cruzi* e são denominadas glicoinositol-fosfolípidos (GIPLs) com motivo lipídico rico em ceramida. Os GIPLs são reconhecidos por um complexo formado por TLR4, CD14 e MD2 (Almeida and Gazzinelli 2001), como evidenciado na figura 3A. Foi demonstrado também que o DNA genômico de protozoários tem um importante papel pró-inflamatório durante a infecção por *T. cruzi*, pois possuem oligonucleotídeos imunoestimulatórios (ODNs) conhecidos como motivos CpG não metilados (Figura 3B). O DNA genômico do *Trypanosoma cruzi* possui uma grande quantidade de motivos CpG que são similares aos de bactéria (Krieg 2002). A atividade pró-inflamatória do DNA de *T. cruzi* é então mediada por TLR9 (Bafica, Santiago et al. 2006), conhecido receptor para esses motivos CpG não metilados (Hemmi, Takeuchi et al. 2000). Esses oligonucleotídeos presentes no genoma do *T. cruzi* são reconhecidos pelo TLR9 do hospedeiro, induzindo a síntese de IL-12 e IFN- γ , sendo, portanto, responsáveis pela resistência do hospedeiro contra a infecção (Bartholomeu, Ropert et al. 2008).

É importante ressaltar que as células B1, que serão mais bem descritas no próximo tópico, também expressam vários TLRs, dentre os quais TLR1-TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9. Quando as células B são ativadas via TLRs, elas rapidamente proliferam e secretam anticorpos. Essa característica têm sido explorada extensivamente como modelo de resposta independente de células T em muitos trabalhos (Genestier, Taillardet et al. 2007; Meyer-Bahlburg, Bandaranayake et al. 2009).

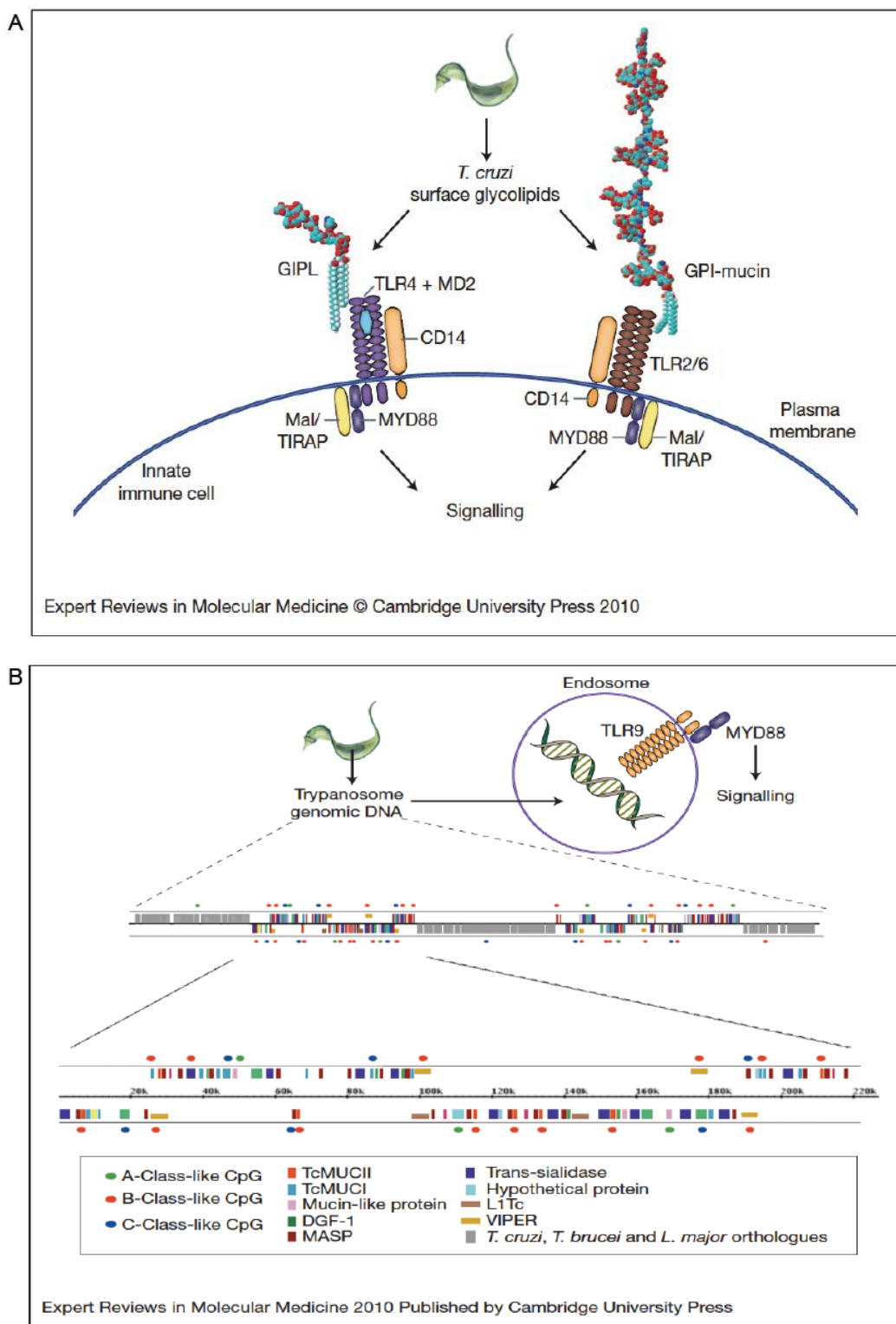


Figura 3 - Detecção do parasito por componentes da imunidade inata. (A) Glicolipídios de superfície do *Trypanosoma cruzi* são capazes de estimular TLRs da superfície de células da imunidade inata. GPI-mucina é reconhecido pelo heterodímero TLR2/6 enquanto os GIPLs são reconhecidos pelo complexo TLR4/MD2/CD14. **(B)** O DNA do *T. cruzi* possui motivos CpGs de todas as classes: A, B e C. Os CpGs de classe B são conhecidos como os mais potentes indutores pró-inflamatórios. (Junqueira et al. 2010).

1.4 Diferentes fenótipos das subpopulações de células B

As células B são divididas principalmente em duas populações: B1 e B2, definidas pelo diferente comportamento destas células a determinados estímulos (Martin and Kearney 2000). As células B1 podem ser divididas em duas subpopulações celulares conhecidas como B1a e B1b, enquanto as células B2 são subdivididas em células B da zona marginal (MZB) e células B foliculares (FO) (Baumgarth 2011). As células MZB podem se comportar de forma similar as células B1, possuindo papéis parecidos em muitos aspectos (Kearney 2005), como evidenciado na tabela 1.

As células B1 possuem um repertório de anticorpos diferente das células B foliculares. As células B1 geram imunoglobulinas poli-específicas e de baixa afinidade (Wang and Clarke 2004), além de expressarem limitadas cadeias pesadas variáveis de Igs (VH) quando comparadas às células B convencionais (Lalor and Morahan 1990).

Outra característica das células B1 é sua sensibilidade aos agonistas de TLRs, os quais podem ativar essas células diretamente e provocar a secreção de Igs. No entanto, as células B2 possuem baixa sensibilidade aos agonistas de TLRs, mas podem também ser estimuladas por eles a proliferar e produzir anticorpos (Gururajan, Jacob et al. 2007).

Dado a capacidade das células B1 de serem ativadas diretamente por PAMPs, elas são denominadas células antígenos timo-independentes (TI), enquanto as células B foliculares são denominadas timo-dependentes (TD), pois estas últimas só podem ser ativadas adequadamente e sofrer a troca de classe quando interagem com as células T (Rawlings, Schwartz et al. 2012). É importante também ressaltar que a qualidade da produção de anticorpos das células B está relacionada com a dependência ou não de células T e o tipo de antígeno reconhecido pela resposta imune (Vinuesa and Chang 2013). Nesse aspecto, as células MZB também apresentam papel imunológico independente de T, sendo estas e os linfócitos B1 chamados de células B inatas, do inglês "*Innate-like B cells ou ILBs*" (Kearney 2005).

Em geral, todas as células B podem fazer troca de classe das Igs e proliferarem em função da ativação mediada por BCR e a interação CD40-CD40L, todavia as células B1 tem uma capacidade limitada neste quesito, enquanto as

células B2 são mais eficazes em proliferar e gerar outras classes de anticorpos quando estimuladas via CD40L (Erickson, Foy et al. 2001). Independentemente de CD40L, as células B1 ativadas via TLRs aumentam sua secreção de IgM e podem sofrer a troca de classe para IgG ou IgA. Já as células B2 são capazes de produzir IgG e IgE quando estimuladas por ligantes de TLRs (Foy and Waldschmidt 1993). Aditivamente, os linfócitos B timo-dependentes interagem de forma muito específica com os antígenos via BCR, posteriormente com as células T nos centros germinativos de órgãos linfóides (GC), portanto são muito habilidosos em gerar células B de memória (Heiser, Snyder et al. 2011; Zhang 2013).

As diferenças fenotípicas e funcionais entre as populações de células B1 e B2 (Tabela 1) gerou duas hipóteses quanto ao desenvolvimento dessas células: “The selection model”, a qual propôs que a resposta a antígenos particulares poderiam direcionar a diferenciação desses linfócitos (Haughton, Arnold et al. 1993); e “The layered immune system hypothesis”, a qual propôs que esses linfócitos são derivados de diferentes linhagens (Herzenberg 1989). De fato, um precursor específico de B1 foi identificado na medula óssea de camundongos neonatos e de fetos, o que provou o modelo formulado anteriormente pelos Herzenbergs (Montecino-Rodriguez, Leathers et al. 2006).

	Activação por BCR	Activação por TLRs	Troca de classe	Antígeno T dependente	Antígeno T independente
B1a	Negativo	Positivo	Limitado	Negativo	Positivo
B1b	Negativo	Positivo	Limitado	Negativo	Positivo
MZB	Positivo	Positivo	Limitado	Negativo	Positivo
FO	Positivo	Limitado	Positivo	Positivo	Negativo

Tabela 1: Fenótipos descritos na literatura para diferentes subpopulações de células B: As células B1 tem um repertório limitado de Igs, mas possuem alta sensibilidade aos estímulos mediados por TLRs, o que colabora com sua independência das células T para serem ativadas. As células B foliculares são dotadas de um vasto repertório de Igs e respondem principalmente a antígenos exógenos, além de necessitarem dos linfócitos T para fazer a troca de classe (Erickson, Foy et al. 2001).

1.5 Marcadores de superfície das células B

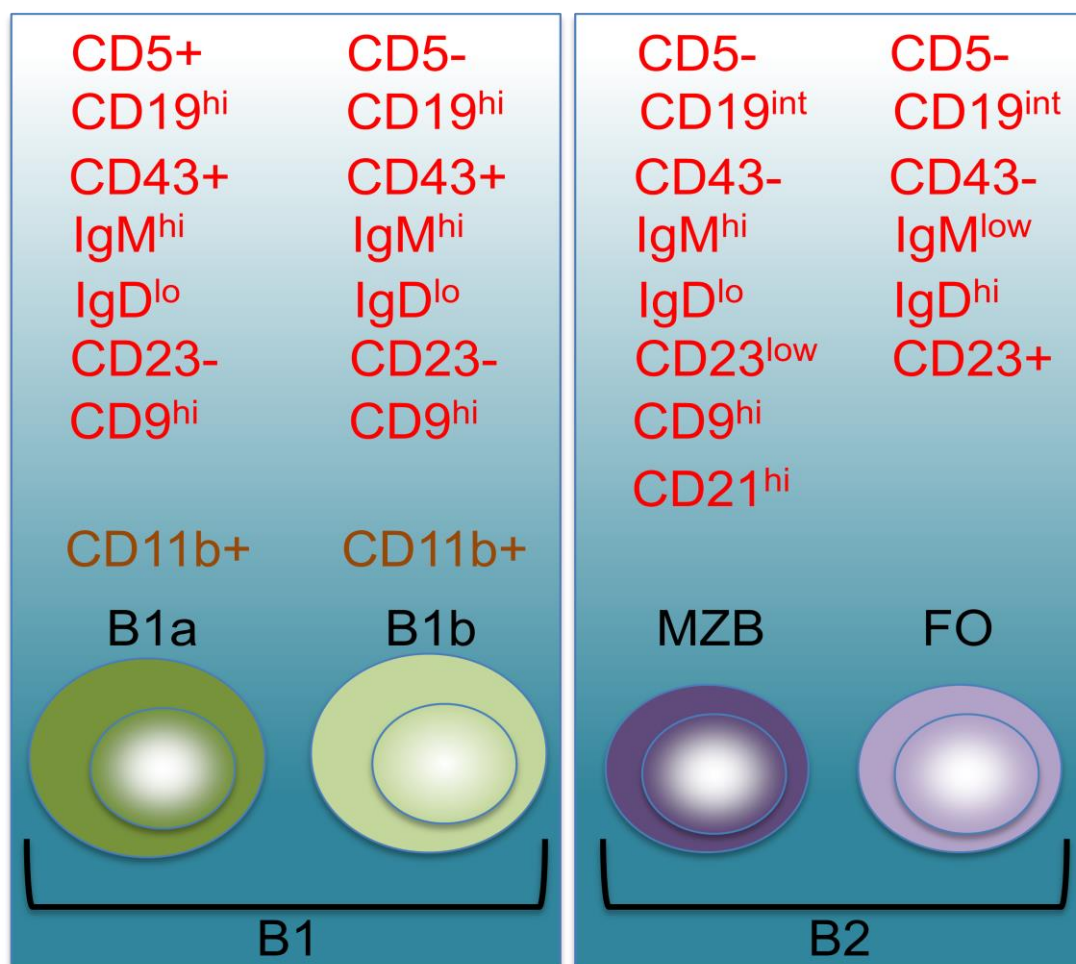
Muitos estudos foram realizados a fim de caracterizar os melhores marcadores de superfície capazes de distinguir as populações de células B. As subpopulações de células B são distribuídas diferencialmente em diferentes órgãos, o que exige estratégias diferentes de marcação para cada órgão estudado (Baumgarth 2004).

O baço de camundongos é fonte de variadas subpopulações de células B, dentre as quais podemos citar: células B1a, B1b, células B da zona marginal (MZB), células B foliculares (FO) e células B imaturas (Ghosn et al. 2012). A presença de diferentes células B no baço dificulta a identificação das mesmas, o que exige o uso de vários marcadores para distingui-las de forma específica. Já nas cavidades peritoneal e pleural, as células B1 (B1a e B1b) são predominantes, o que facilita sua identificação (Figura 5) (Rawlings et al. 2012).

Comparando as duas principais populações de células B, podemos destacar alguns marcadores expressos diferencialmente entre B1 e B2. As células B1 expressam altos níveis de IgM e CD19, além de baixos níveis de IgD e B220 quando comparadas com as células B2 (Tabela 2). Outro bom marcador para diferenciar essas populações é o CD43, que tem sido descrito nas células B da medula óssea em desenvolvimento, mas é também expresso em células B1 maduras (Wells, Kantor et al. 1994). O contrário ocorre com a molécula CD23, que é expressa na superfície de células B2, mas não é expressa em linfócitos B1 (Waldschmidt, Kroese et al. 1991). Além disso, grande parte das células B1 da cavidade peritoneal e da pleura expressam baixos níveis da molécula CD11b, uma integrina muito expressa em macrófagos e neutrófilos (Tabela 2). A molécula CD9 pode ser útil também, porque as células MZB, B1 e plasmáticas expressam altos níveis desta, facilitando a exclusão de B FO (Won and Kearney 2002). Podemos ainda subdividir as células B1 em dois grupos distintos: B1a e B1b. Para tanto o único marcador bem estabelecido é o CD5, o qual somente é expresso pelas Células B1a (Figura 5) (Oliveira et al. 2009).

As células B2 também podem ser divididas em duas subpopulações distintas. A primeira é a célula B da zona marginal (MZB) que possui na superfície da sua membrana altos níveis de CD21, enquanto a segunda é a célula B folicular, que expressa baixos níveis ou nenhum deste marcador (Tabela 2).

Restam ainda as células B imaturas que estão presentes no baço de camundongos e são caracterizadas por expressarem IgM, mas não IgD (Flaishon, Becker-Herman et al. 2004).



Adaptado de Nicole Baumgarth et al. 2010

Tabela 2: Marcadores de superfície das subpopulações de células B: As células B são divididas em pelo menos dois grupos principais: B1, o qual inclui B1a e B1b, e B2, que inclui as células B MZB e as células B FO. A molécula em destaque, CD11b, é expressa pelas células B1 na cavidade peritoneal e pleura, mas perdem a expressão desta integrina ao deixar estes locais (Baumgarth et al. 2010).

1.6 Produção de citocinas por células B

A produção de citocinas por células B em modelo murino é estudada há muitos anos e alguns autores tem descrito a importância dessas células neste contexto (O'Garra, Stapleton et al. 1990). Estes estudos também não são recentes em humanos, e tem mostrado relevância biológica em alguns trabalhos científicos (Pistoia 1997).

Assim como as células T, as células B podem produzir citocinas de acordo com o perfil da resposta imune elicitada, o que depende do tipo de agente que a provocou. Desta forma, essas células podem secretar IL-12 e IFN- γ quando influenciadas pelo perfil Th1 de células T, mas também podem produzir IL-4 e IL-5 quando envolvidas em uma resposta do tipo Th2. Assim como as células T podem influenciar o tipo de citocinas produzidas por células B, o contrário também já foi demonstrado (Harris, Haynes et al. 2000).

A secreção de IL-10 por células B tem sido muito estudada devido a grande capacidade dessas células em produzi-la. Mas estes estudos relacionam o papel imunoregulador das células B principalmente às doenças autoimunes, como a encefalite alérgica experimental (EAE) e lúpus eritromatoso sistêmico (SLE) (Matsushita, Horikawa et al. 2010; Watanabe, Ishiura et al. 2010). Alguns trabalhos avaliaram o papel de B1 em doenças causadas por protozoários (Hoerauf, Solbach et al. 1994; Chen, Aosai et al. 2000), mas muito pouco foi descrito sobre o papel regulador dos linfócitos B1 na infecção por *Trypanosoma cruzi*, o que não esclarece completamente o mecanismo de ativação dessas células. Destes, alguns trabalhos descrevem que o IL-10 produzido por estas células é prejudicial à resposta imune do hospedeiro (Minoprio, Coutinho et al. 1991; Minoprio, el Cheikh et al. 1993). É importante ressaltar que a variabilidade de cepas existentes do *T.cruzi* e a quantidade de modelos de camundongos usados para estudar essa infecção configura a necessidade de mais estudos acerca deste assunto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.

Avaliar a resposta efetora das células B ante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e ao estímulo com oligonucleotídeos imunoestimuladores derivados do parasito

2.2 Objetivos específicos.

- Avaliar a sensibilidade de diferentes populações de células B a CpGs derivados do protozoário *Trypanosoma cruzi*
- Discriminar as populações de B mais eficientes na produção de citocinas pró-inflamatórias e também anti-inflamatórias após estímulo com CpGs de *T. cruzi*
- Averiguar o papel regulador das células B na infecção pelo *T. cruzi*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Camundongos C57BL/6 fêmeas e TLR9^{-/-}, de 8 a 12 semanas de idade foram adquiridos junto ao Biotério de Produção (BIOT) do Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-MG, e mantidos de acordo com as recomendações de padrões institucionais.

3.2 Caracterização de células por citometria de fluxo

Células extraídas do baço ou da cavidade peritoneal (PerC) foram incubadas com anti-CD16/CD32 para bloquear os receptores de Fc FcγRII/III e incubadas no gelo por 20 minutos com os seguintes anticorpos conjugados com fluorocromos: CD5 (53-7.3)-PECy7, CD11b (M1/70)-FITC ou CD11b (M1/70)-PE, CD19 (1D3)-APCCy7, CD23 (B3B4)-FITC, CD43 (R2/60)-PE, IgD (11-26)-Pacific blue, IgM (II/41)-APC, F4/80 (BM8)-APC, MHCII (M5/114.15.2)-PECy5, CD86 (GL1)-PECy5, CD80 (16-10A1)-PE, CD40 (3/23)-FITC, B220 (RA3-6B2)-PercPCy5.5. As células foram então lavadas e ressuspensas em tampão de FACS (PBS + 2% SFB) e analisadas no citometro de fluxo LSR FORTESSA (Becton Dickinson). Os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmingen ou da eBioscience. Os dados foram coletados e então analisados com o software FlowJo (versão 9.5.1).

3.3 Purificação de células

Para purificação de células, a cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 foi lavada por duas vezes com 5 ml de meio RPMI completo e a suspensão celular foi rapidamente colocada no gelo. Foram necessários em torno de 10 camundongos para cada processo de purificação. As células coletadas foram incubadas com anti-CD16/CD32 para bloquear os receptores de Fc FcγRII/III e incubadas no gelo por 20 minutos com os seguintes anticorpos conjugados com

fluorocromos: CD11b (M1/70)-FITC ou CD23 (B3B4)-FITC, CD19 (1D3)-APCCy7, IgD (11-26)-Pacific blue, F4/80 (BM8)-APC. Para o processo de purificação dessas células nós utilizamos o citometro de fluxo FACS ARIA II (Becton Dickinson). As células foram coletadas em meio RPMI completo (acrescido de 5% SFB, penicilina a 100 U/ ml e estreptomicina a 100 µg/ml), e quantificadas em camara de Neubauer.

3.4 Manutenção da cepa de *T. cruzi*

Utilizamos a cepa de *T. cruzi* CL, a qual não é letal para os camundongos C57BL/6 utilizados em nossos experimentos. O parasito foi mantido viável por passagens *in vivo* e por fim o sangue de camundongos infectados foi coletado e o parasito foi mantido em cultura no meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% SFB, penicilina a 100 U/ ml e estreptomicina a 100 µg/ml em estufa B.O.D a 28°C.

3.5 Estímulo *in vitro* com CpGs

Células B1, B2 e macrófagos, todas purificadas da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 ou TLR9^{-/-}, foram ressuspendidas em meio RPMI completo. Em seguida, 2 x 10⁵ células foram distribuídas por poço em placas de 96 poços e ressuspendidas em 200ul de meio com ou sem estímulo. Os seguintes estímulos foram utilizados: CpG 2707 e LPS (derivados de bactéria), CpG B297 e CpG B344, os dois últimos de *T.cruzi*. O estímulo com LPS foi utilizado como controle interno, assim como o estímulo com CpG em camundongos TLR9^{-/-} e não foram mostrados neste trabalho. Todos os CpGs foram adquiridos da empresa Alpha DNA e o LPS da Sigma Alderich.

3.6 Infecção de camundongos

Para infectar os camundongos, foram utilizados parasitos da cepa CL de *T. cruzi* com cerca de 15 dias após a última transferência para o meio LIT, a fim de obter a maior quantidade possível de tripomastigotas metacíclicos. Os parasitos foram então contados e um total de 5.000 tripomastigotas foram utilizadas para infectar os camundongos via intraperitoneal (i.p.).

3.7 Detecção e quantificação de citocinas por CBA

As concentrações de IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e MCP-1 foram determinadas nos sobrenadantes das culturas de células previamente estimuladas com CpG. Para tanto foi utilizado o kit BD Cytometric Bead Array Inflammation (BD Biosciences), de acordo com a indicação do fabricante. Brevemente, o total de 1800 eventos dentro do gate de beads foi adquirido no citômetro BD FACS Calibur (BD Bioscience). A concentração de citocinas em cada amostra foi calculada usando o programa BD FCAP Array, versão 1.0.1. (BD Biosciences).

3.8 Detecção e quantificação de citocinas por ELISA

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticorpo de captura anti-IFN- γ diluído em PBS e deixadas 12 horas a temperatura ambiente. Realizamos o processo de lavagem dos poços com PBS acrescido de 0.05% de tween 20 (Sigma). Após esse período os poços receberam o tampão de bloqueio preparado de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante e a placa foi incubada a temperatura ambiente por uma hora. Lavamos os poços e colocamos então os sobrenadantes de células estimuladas com CpGs e incubamos por 2 horas adicionais. Outro processo de lavagem foi feito, então aplicamos o anticorpo

conjugado com biotina, seguindo um período de incubação de 2 horas com as placas protegidas da luz. Lavamos os poços novamente e aplicamos o conjugado estreptavidina-peroxidase por 20 minutos, realizando depois outra lavagem. Por fim incluímos o substrato a base de tetrametilbenzidina (TMB) e tampão citrato na presença de H₂O₂ e esperamos a reação colorimétrica que foi interrompida com uma solução de H₂SO₄ diluída 20 vezes a partir da solução estoque: 95-98% (Quimex). As absorbâncias foram quantificadas em espectrofotômetro a 450 nm.

3.9 Detecção de citocinas pela metodologia de marcação intracelular

As células extraídas do PerC foram ou não estimuladas com 3µM de CpG. As células derivadas do baço foram ou não estimuladas com 10 µg/ml de antígeno total de *T. cruzi* para o cultivo de esplenócitos por 12 horas, ambas as culturas acrescidas de Golgi stop plus (eBioscience). O sobrenadante com estímulo foi retirado após centrifugação e as células foram ressuspensas em meio RPMI completo para retirar os resíduos de Golgi stop e do estímulo. Após lavagem adicional, procedeu-se a marcação das moléculas de superfície. As células foram incubadas com anti-CD16/CD32 para bloquear os receptores de Fc FcγRII/III e marcadas no gelo por 20 minutos com os seguintes anticorpos conjugados com fluorocromos: CD5 (53-7.3)-PECy7, CD11b (M1/70)-FITC, CD19 (1D3)-APCCy7, IgM (II/41)-APC. As células foram então lavadas com tampão de FACS e ressuspensas em tampão de permeabilização/fixação (BD Pharmingen). Permaneceram em incubação de 20 minutos a temperatura ambiente, foram então lavadas com tampão de permeabilização (BD Pharmingen) e marcadas internamente com os seguintes anticorpos diluídos em tampão de permeabilização: TNF-α-PE (cat:554419), IL-6-PE (cat:554401), IL-10-PE (cat:554467). Em seguida as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de FACS (PBS + 2% SFB) e analisadas no citometro de fluxo LSR Fortessa (BD

Bioscience). Os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmingen ou da eBioscience. Os dados foram coletados e então analisados com o software FlowJo (versão 9.5.1).

3.10 Detecção de anticorpos pela metodologia ELISA

O sobrenadante das culturas celulares descritas acima (item 3.9) foram submetidos ao ELISA para detecção de IgM produzida em resposta aos CpGs. Para tanto, 100 µl de sobrenadante de cada poço foi utilizado para sensibilizar a placa de ELISA por 12 horas. Em seguida a placa foi lavada com PBS acrescido de tween 20 (Sigma) e com PBS puro. Anticorpo anti-IgM biotilado foi adicionado (Sigma) e seguiu-se uma incubação de 2 horas a 37°C. Solução substrato de TMB diluído em tampão citrato acrescido de H₂O₂ foi adicionada à placa. Após revelação da reação cromogênica, a reação foi interrompida com H₂SO₄ diluída 20 vezes a partir da solução estoque. As absorbâncias foram quantificadas em espectrofotômetro a 450 nm.

3.11 Cultivo de esplenócitos

Os baços dos camundongos infectados ou não com a cepa CL de *T. cruzi* foram coletados 21 dias após a infecção. Para a obtenção de esplenócitos, os baços foram macerados e filtrados utilizando uma malha de nylon de 100 µm (BD Biosciences), lavados em meio de cultura celular RPMI 1640 (Sigma) contendo 5% soro fetal bovino (SFB), penicilina a 100 U/ml e estreptomicina a 100 µg/ml, e então centrifugadas a 300 g, 4°C por 10 min. Na sequência as amostras foram submetidas a lise de células vermelhas (RBCs) pelo tampão de lise. Os esplenócitos remanescentes foram lavados 2 vezes em RPMI + 5% SFB e finalmente ressuspensos em 1 ml de RPMI 1640 + 10% SFB + 0,2% de sobrenadante de células EL-4 contendo IL-2. Os esplenócitos foram diluídos em

Azul de Tripán 0,04% para contagem em câmara de Neubauer e 1 milhão de células foram plaqueadas por poço com ou sem antígeno total de *T. cruzi*. Parte da suspensão celular foi submetida diretamente ao método de marcação de superfície e intracelular para identificação das subpopulações celulares produtoras de citocinas, processo posteriormente feito também com as células que foram estimuladas.

3.12 Plotagem de dados e estatística

Todos os gráficos gerados foram plotados e analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad). A comparação entre grupos foi feita usando o teste t para amostras não pareadas.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das populações celulares da cavidade peritoneal

A fim de caracterizar as populações celulares do PerC de camundongos C57BL/6 com aproximadamente 8 semanas de idade, utilizamos a técnica de citometria de fluxo e identificamos a seguinte distribuição relativa de células: 10% são células T, identificadas pela expressão de CD3, 25% são macrófagos, identificados pela expressão de F4/80, mais de 50% são células B, identificadas pela expressão de CD19. Adicionalmente, as subpopulações de células B1 e B2 foram reveladas pela expressão diferencial de CD43 e CD11b. Pouco mais de 10% são células que não foram marcadas com nenhum anticorpo monoclonal utilizado. As células B1 são predominantes na cavidade peritoneal e contribuem com cerca de 40% de todas as células coletadas no lavado peritoneal e as células B2 correspondem a pouco mais de 10% do exudato (Figura 4).

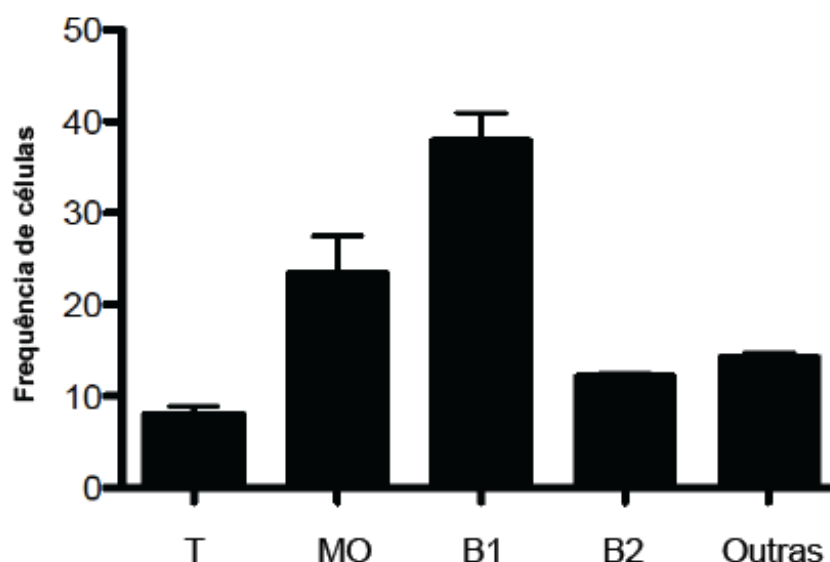


Figura 4: Populações celulares da cavidade peritoneal: Células do PerC foram extraídas de 3 camundongos saudáveis e identificadas de acordo com a expressão de moléculas de superfície. Foram usados os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: CD11b (M1/70)-FITC, CD19 (1D3)-APCCy7, CD3 (145-2c11)-FITC, CD43 (R2/60)-PE, F4/80 (BM8)-APC.

4.2 Caracterização das subpopulações de células B da cavidade peritoneal

A fim de definir as subpopulações de células B1 da cavidade peritoneal, nós identificamos, além dos marcadores convencionais de células B, o CD11b, o qual é expresso por células B1 neste local e utilizamos o CD5 para diferenciar as células B1a de B1b. Esta análise mostrou que as células B1a correspondem a cerca de 70% de todas as células B1 presentes no PerC.

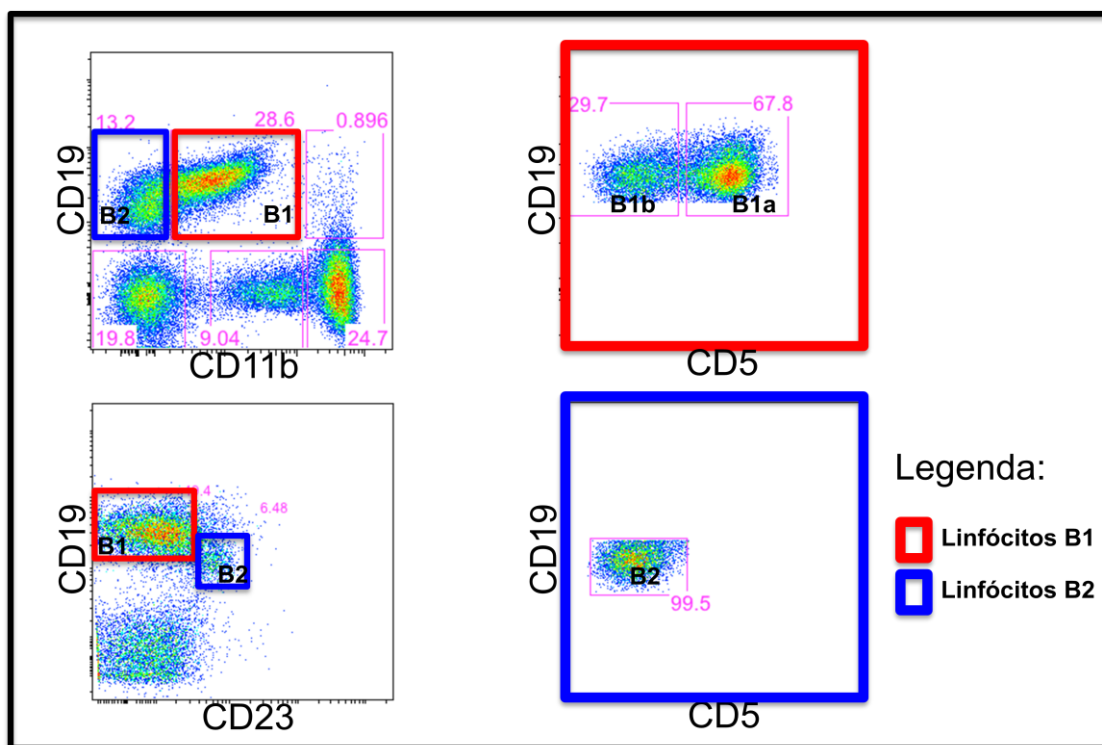


Figura 5: Perfil das subpopulações de células B da cavidade peritoneal: As células B1 (vermelho) da cavidade peritoneal foram distinguidas das demais pela expressão de baixos níveis de CD11b ou pela ausência de CD23 (plots a esquerda). As células B2 também estão indicadas (azul). As subpopulações de B1 foram separadas pela expressão de CD5, o qual está presente somente nas células B1a (plots a direita).

4.3 A infecção com *Trypanosoma cruzi* leva ao aumento imediato da população de células B1 na cavidade peritoneal

Após caracterização do perfil de células da cavidade peritoneal, camundongos C57BL/6 foram infectados com *T. cruzi* e alterações nas subpopulações de células B foram avaliadas.

Nas primeiras oito horas após a infecção, um aumento significativo das células B1 foi observado neste sítio (Figura 6), o que sugere que estas células estão sendo estimuladas a proliferarem ou a migrarem para o sítio da infecção.

Em outro trabalho, utilizando camundongos BalbC e a cepa Tulahuén de *T. cruzi*, foi demonstrada a redução do número total de células B1 do peritônio em torno de 15 dias após a infecção (Merino, Montes et al. 2010). No entanto, não há trabalhos de outros grupos na literatura relacionando a infecção por *T. cruzi* com alterações no número de linfócitos B1 da cavidade peritoneal.

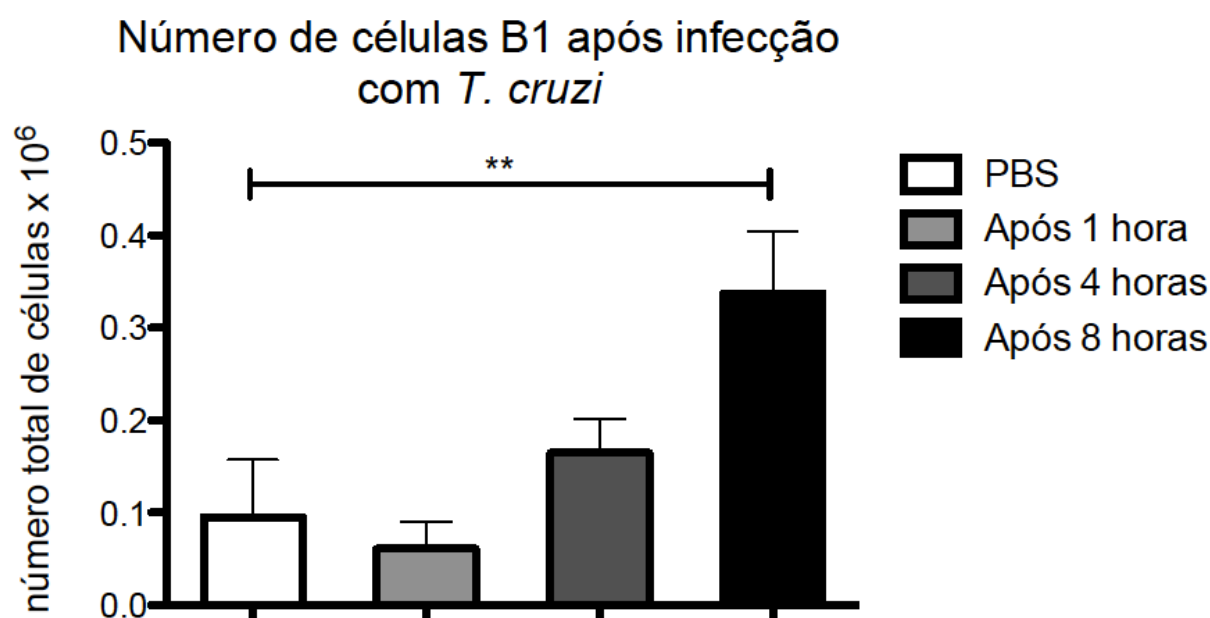


Figura 6: Infecção com *T. cruzi* causa mudanças no número total de células B1 da cavidade peritoneal: Camundongos infectados com 5.000 parasitos da cepa CL foram sacrificados e o lavado peritoneal foi coletado e utilizado para quantificação celular e marcação de moléculas de superfície para avaliação por citometria de fluxo (** $p < 0.01$).

4.4 Estímulo com CpGs derivados de *T. cruzi* leva ao aumento da expressão de moléculas coestimulatórias em células B1 *in vivo*

Sabe-se que as células B1a expressam constitutivamente moléculas coestimulatórias usadas para indicar a ativação de células como CD40, CD80 e CD86. Nossos dados mostram que as células B1a apresentaram um aumento da expressão de CD40 24 horas após a infecção por *T. cruzi* e também após estímulo *in vivo* com o CpG B344 proveniente do parasito, o que indica sua ativação. As células B1b apresentaram um perfil mais claro de ativação indicado pela expressão de CD40 e CD86, tanto para a infecção com o parasito quanto para o estímulo com o CpG B344. No entanto as células B2 não sofreram nenhuma alteração evidente na expressão de moléculas coestimulatórias após o estímulo (Figura 7).

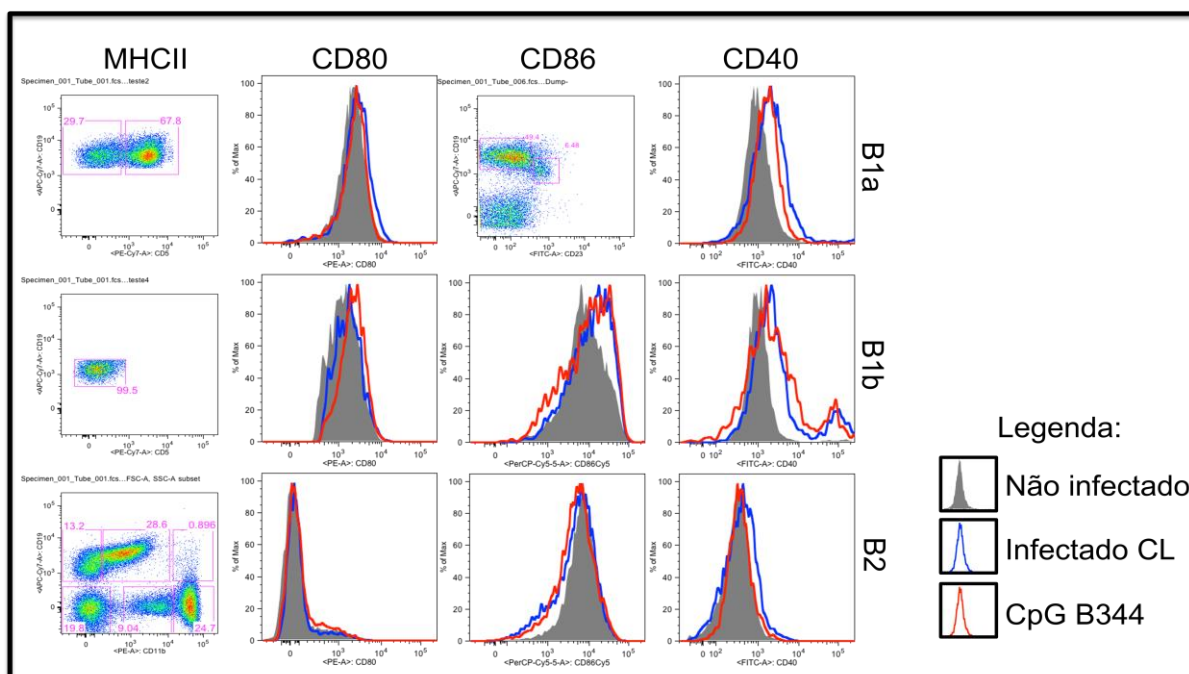


Figura 7: Expressão de moléculas coestimulatórias por células B: Células do PerC de camundongos infectados com *T. cruzi* ou que foram estimulados com o CpG B344 do parasito foram avaliadas por citometria de fluxo para expressão de moléculas coestimulatórias (CD40,CD80,CD86,MHCII).

4.5 Os linfócitos B purificados secretam IgM após estímulo com CpGs de *T. cruzi*

Visto que a expressão de algumas moléculas coestimulatórias indicaram a ativação das células B1 *in vivo* pelo estímulo com CpG e pela infecção com o parasito, decidimos verificar *in vitro* se essas células secretariam anticorpos após estimuladas, a fim de confirmar funcionalmente sua ativação. Para isso, nós purificamos as células B1, B2 e macrófagos (MØ) do PerC com a utilização do FACS ARIA II. Uma pureza acima de 95% foi obtida para todas as células purificadas (Figura 8)

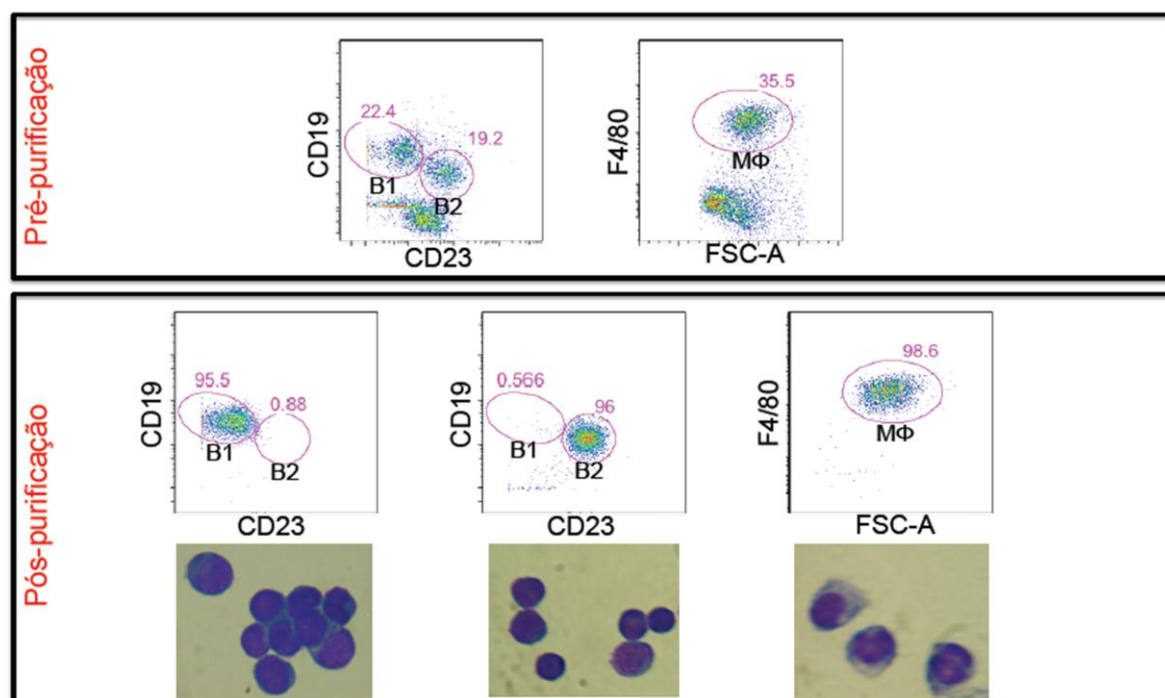


Figura 8: Purificação de células por citometria de fluxo: Células da cavidade peritoneal foram marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos para discriminar as populações a serem purificadas. As células B1 foram selecionadas pela ausência de expressão da molécula CD23, enquanto as células B2 foram selecionadas por serem positivas para esta molécula (plot superior a esquerda). As células B1 expressam níveis mais altos do marcador CD19 do que as células B2 (plot superior a esquerda). Os macrófagos (MØ) foram selecionados pela expressão de F4/80 para a purificação (plot superior a direita). A pureza do processo de separação foi confirmada como demonstrado nos plots inferiores. Esfregaços foram realizados utilizando-se as suspensões de células purificadas que foram evidenciadas por coloração com Giemsa para avaliação morfológica (imagens inferiores).

Após purificadas no FACS ARIA II, as células B1 e B2 foram estimuladas com CpGs derivados de *Trypanosoma cruzi* (CpG B297 e CpG B344) e CpG 2707 controle derivado de Bactéria (CpG+). Os estímulos foram dados por 12 horas, em seguida retirados para a avaliação da presença de anticorpos IgG e IgM após 24 e 72 horas de cultivo. Anticorpos IgG não foram detectados, entretanto nós demonstramos que ambas as células B1 e B2 estimuladas com os oligonucleotídeos foram capazes de secretar IgM após o estímulo (Figura 9).

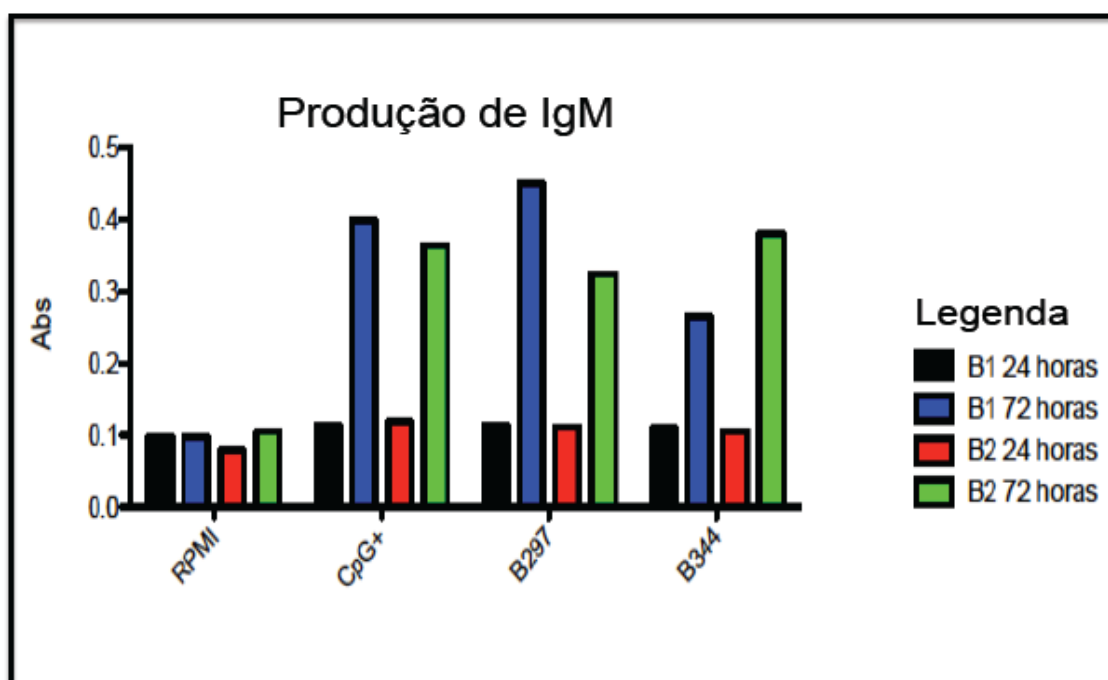


Figura 9: Produção de anticorpos após estímulo in vitro: Células previamente purificadas do PerC de 10 camundongos C57BL/6 foram distribuídas em placas de 96 poços (2×10^5 /poço) e estimuladas ou não com CpGs por 12 horas e mantidas em cultura por mais 12 ou 60 horas sem estímulo. A produção de anticorpos foi pesquisada por ELISA e mostrou que as células B rapidamente respondem ao estímulo com a secreção de IgM.

4.6 Estímulo de células B purificadas com CpG de *T. cruzi* indica capacidade regulatória de células B1

Confirmada a ativação das células B pelos CpGs derivados de *T. cruzi*, avaliamos também a produção de citocinas por células B purificados. Nossos resultados mostram que tanto as células B1 como as células B2 estimuladas com CpGs produziram TNF- α , IL-6 e IL-10, conforme gráfico representativo para produção

de IL-10 identificado pela técnica de marcação intracelular (Figura 10A). As frequências de células B1 produtoras de TNF- α , IL-6 e IL-10 foram maiores que as frequências das células B2 produzindo as mesmas citocinas (Figura 10B).

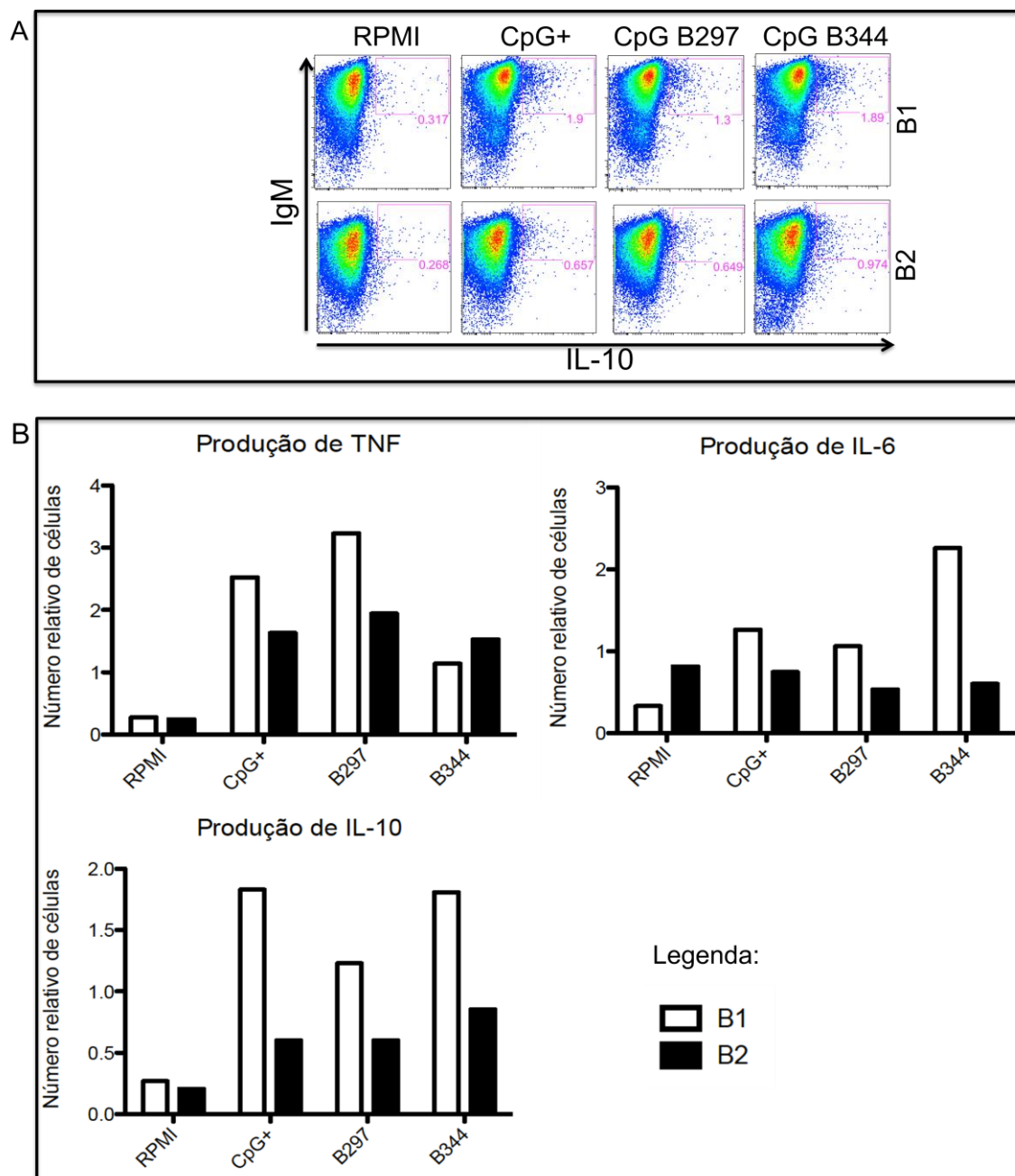


Figura 10: Frequência de células B produtoras de citocinas: Plots representativos da expressão de IgM e IL-10 foi avaliada nas subpopulações de células B1 (plots superiores) e B2 (plots inferiores), previamente purificadas (A). Frequência de células B1 e B2 produzindo de TNF α , IL-6 ou IL-10 estimuladas ou não com CpG por 12 horas (B). Dados representativos de três experimentos com resultados similares.

Em seguida, nós quantificamos a produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1 de células B1, B2 e M ϕ purificados. Baixos níveis de TNF- α e níveis moderados de IL-6 foram produzidos ambos por B1 e B2 após o estímulo com os agonistas de TLR9, enquanto os M ϕ purificados secretaram grande quantidade dessas citocinas, o que corrobora com seu papel pró-inflamatório. Todavia os linfócitos B1 foram os mais significativos produtores de IL-10 em relação às outras células da cavidade peritoneal testadas (Figura 11). A produção de MCP-1 foi utilizada como controle de pureza da purificação de células, visto que esta citocina pode ser produzida por macrófagos, mas não por células B.

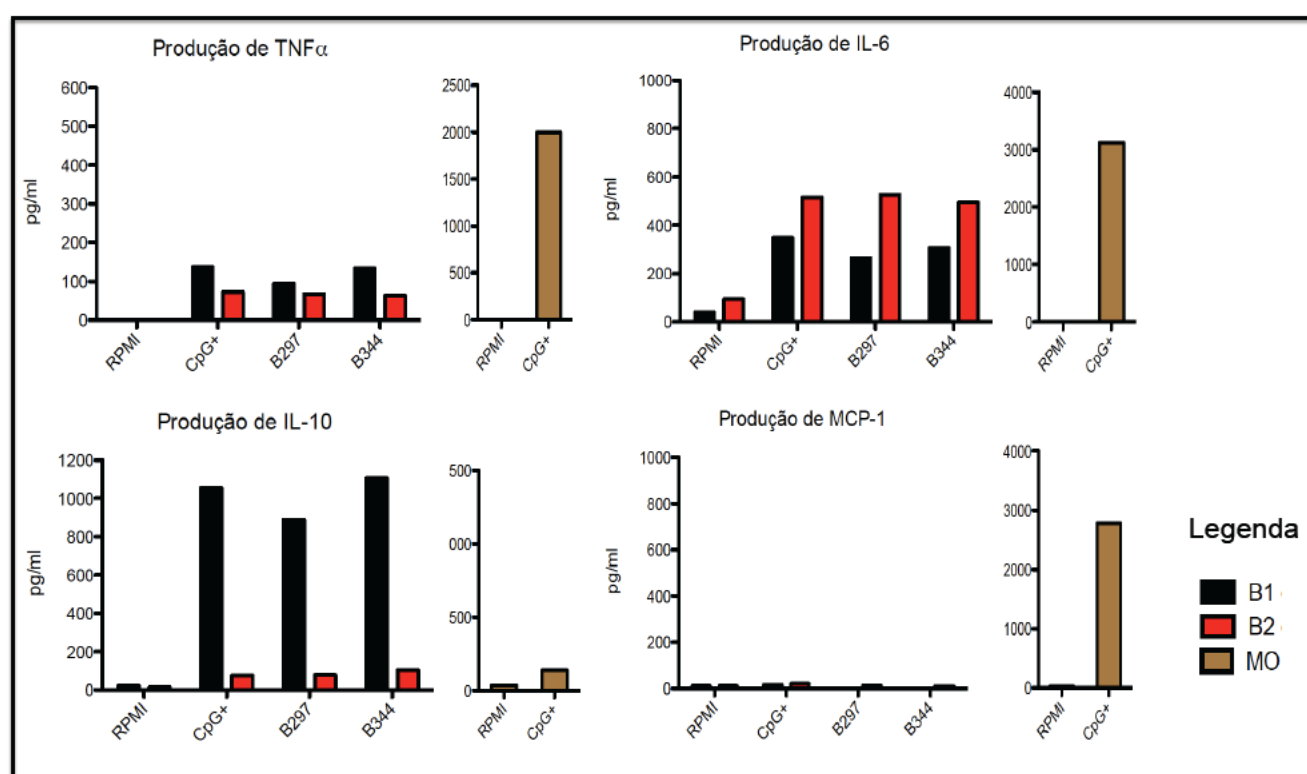


Figura 11: Quantificação da produção de citocinas por células B: Níveis de TNF- α , IL-6, IL-10 e MCP-1 foram avaliados em sobrenadante de cultura de células, purificadas por citometria de fluxo, da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 estimuladas ou não com CpG e LPS por 12 horas. Purificação realizada com células da cavidade peritoneal de 10 camundongos.

4.7 As células B1a são as principais produtoras de IL-10 da cavidade peritoneal

Verificado a capacidade das células B1 em secretar TNF- α , IL-6 e IL-10 após estímulo com CpGs derivados de *T. cruzi*, realizamos experimentos com as células totais da cavidade peritoneal a fim de determinar qual das subpopulações de B1 teria

maior contribuição na produção dessas citocinas. A produção dessas citocinas pelas células B1a, B1b e B2 foi avaliada por citometria de fluxo. Todas as citocinas testadas foram detectadas nas células B1a, B1b e B2, no entanto o número total de células B1a produtoras de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e IL-10 é maior do que o das células B1b e B2 (Figura 12). Os macrófagos são os mais eficientes produtores de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6, conforme mostrado na figura 9, ficando os linfócitos B1a como os mais significativos produtores de IL-10 das células avaliadas.

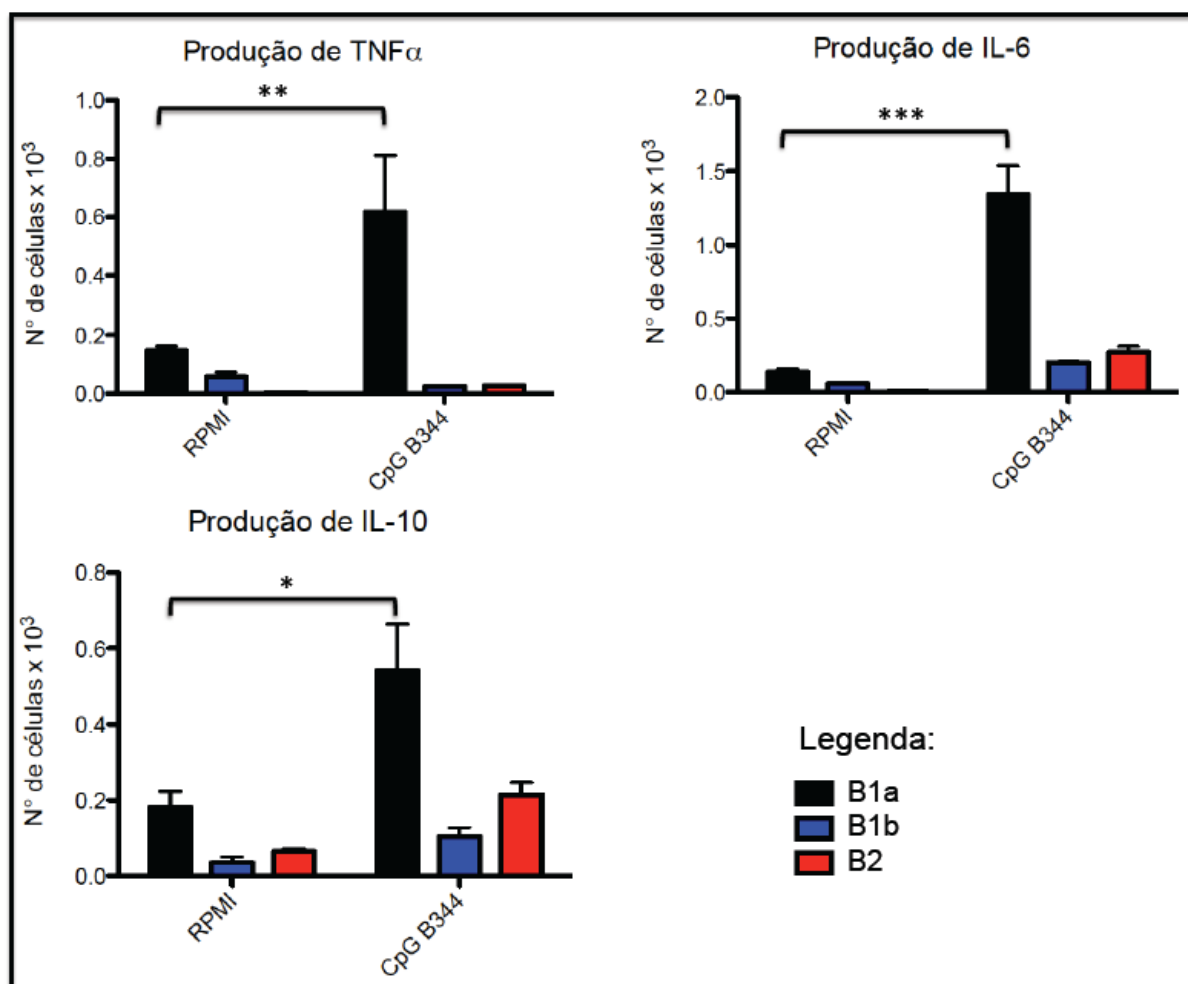


Figura 12: Produção de citocinas por subpopulações de células B1: Células totais do PerC foram estimuladas com CpGs por 12 horas e submetidas à técnica de marcação intracelular de citocinas. O número total de células produtoras de citocinas foi avaliado para comparar as principais populações de linfócitos B. As células B1 se destacaram para todas as citocinas avaliadas. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

4.8 Produção de IL-10 por células B no baço indicam seu papel regulatório mais tardio na fase aguda da infecção

Demonstramos *in vivo* que as células B1 são ativadas 24 horas após estímulo com o CpG B344 ou com o parasito vivo. Também demonstramos que estas células estimuladas *in vitro* com CpGs secretam IL-10. Então resolvemos estudar as células B presentes no baço, onde as células B foliculares são predominantes. A ativação das células B foliculares é dependente da interação destas com as células T, sinalização que ocorre através da interação entre o CD40 em B e o CD40L em T, como citado anteriormente.

Devido à ativação dos linfócitos T e B serem a assinatura da imunidade adquirida e por causa do tempo necessário para que esse processo ocorra, nós avaliamos as células do baço 21 dias após a infecção. Além disso, neste período de tempo este órgão encontra-se maior devido a um grande processo inflamatório. Avaliamos se as células B do baço tinham um papel importante quanto à produção de citocinas e também avaliamos quais as subpopulações de B estariam envolvidas neste processo.

Demonstramos que as células B do baço de camundongos infectados com *T. cruzi* produzem IL-10 (Figura 13A), o que pode ser relevante, dado a grande proporção de células B encontradas neste órgão. Células CD19+ (linfócitos B) foram também avaliadas para expressão de IgM, que pode estar reduzido em células plasmáticas (secretoras de anticorpos). A frequência de células B produtoras de IL-10 aumenta significativamente em camundongos infectados com *T. Cruzi*, tanto para as células IgM+ quanto IgM- (Figura 13B). Além disso, essas células em sua maioria expressaram CD5, o que permitiria classifica-las como células B1a. Todavia, já foi descrito que as células B regulatórias podem expressar CD5 (Baumgarth 2011).

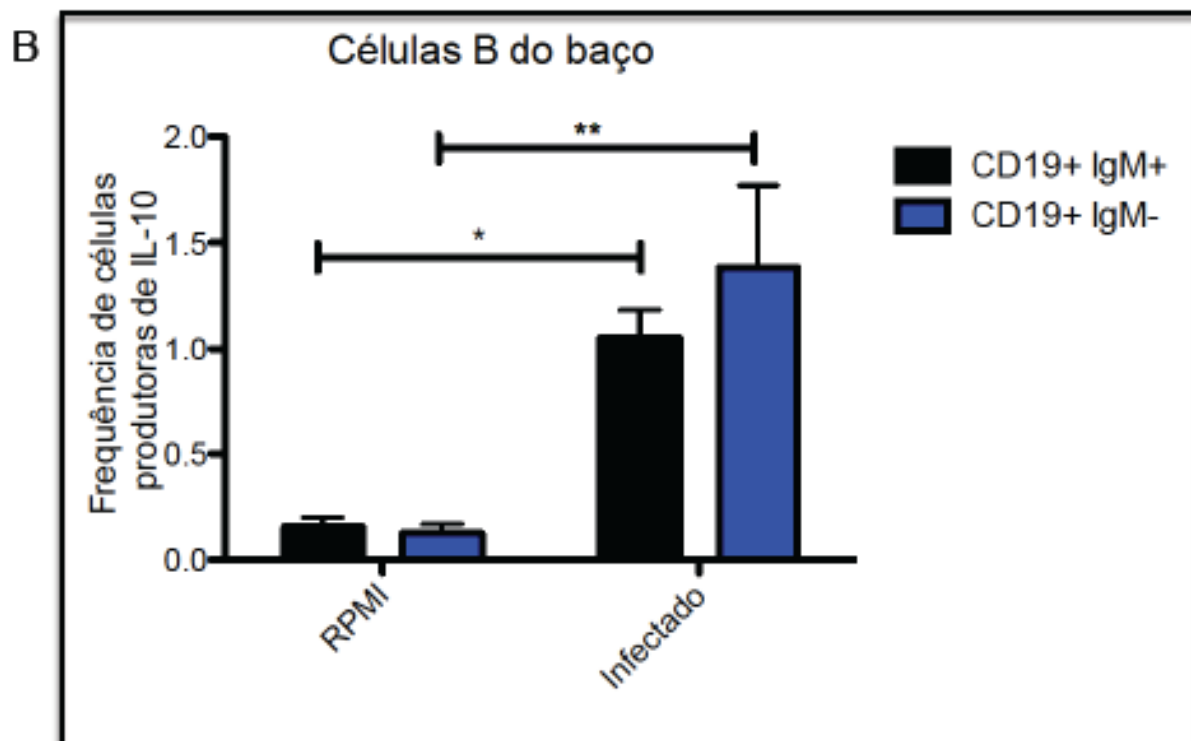
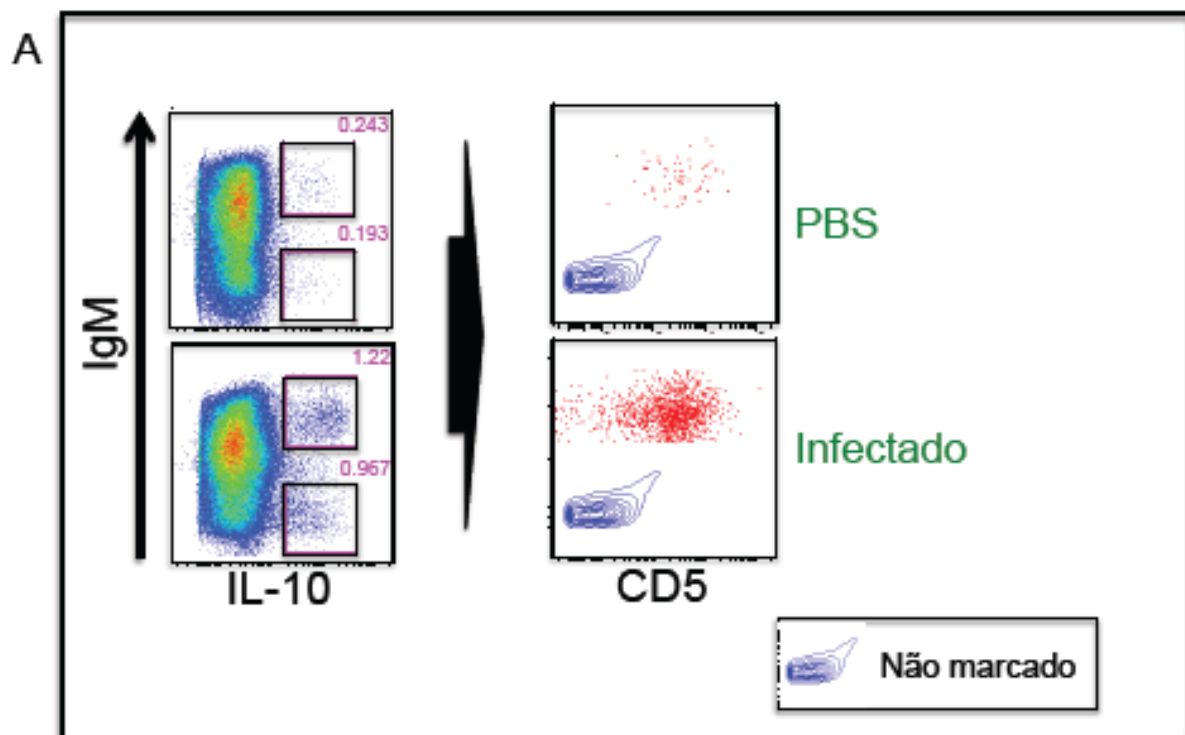


Figura 13: Avaliação de células B produtoras de IL-10 no baço: Células extraídas do baço de camundongos infectados por *T.cruzi* foram marcadas com CD19, IgM, IL-10 e CD5 e avaliadas por FACS (A). A frequência de células CD19+ produtoras de IL-10 foram avaliadas nas células IgM+ e IgM-. O experimento foi realizado 21 dias após a infecção com a cepa CL do parasito. (* $p < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Ativação de células B via TLRs

A sinalização dos receptores TLRs é de certo modo restrita a um espectro limitado de ligantes (Akira, Uematsu et al. 2006). Os ligantes de TLRs mais estudados em linfócitos B incluem os lipopolissacarídeos (para TLR4) e CpGs contidos no DNA (para TLR9) (Peng 2005).

Em modelo murino, foi mostrado que as diferentes subpopulações de B expressam diferentes níveis de mRNA de alguns TLRs. O grupo de B1 e MZB expressam maiores níveis de mRNA para TLR2, 6 e 7 do que B FO. Por outro lado, os níveis de mRNA para TLR8 são maiores nas células B2 do que em B1 e MZB. Não foi observada diferenças significativas de expressão do receptor TLR9 entre essas células (Barr, Brown et al. 2007). Experimentos in vitro tem mostrado que agonistas de TLR9 (CpG) potencializam a proliferação de células B naive na presença de sinais mediados por BCR e células T, o que permite a diferenciação de B em células plasmáticas (Ruprecht and Lanzavecchia 2006). Também foi mostrado que CpGs sintéticos são capazes de aumentar os níveis de BLYS (Proteína Estimuladora de Linfócito B) e APRIL (Ligante Indutor de Proliferação), potencializando a secreção de anticorpos (Katsenelson, Kanswal et al. 2007).

Nós verificamos o aumento da expressão de moléculas coestimulatórias em células B1, as quais indicaram a ativação dessas células no nosso modelo. Também detectamos anticorpos IgM no sobrenadante de células B1 e B2 estimuladas com CpGs de *T. cruzi*. Nesse contexto, nós colaboramos com os estudos na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, modelo em que a ativação desses linfócitos via agonistas de Toll não é bem descrita, nem as alterações provocadas nas moléculas de superfície de B.

5.2 TLRs e ativação de células B1 na infecção por *Trypanosoma cruzi*

A infecção por *Trypanosoma cruzi* é há muito tempo estudada e nosso laboratório participou ativamente na caracterização dos mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro contra o parasito (Gazzinelli, Galvao et al. 1988; Gazzinelli, Galvao et al. 1993; Gravina, Antonelli et al. 2013). Alguns trabalhos destacaram o papel de TLR9 como um dos principais mediadores da resposta imune

contra o parasito em camundongos (Bafica, Santiago et al. 2006). Mas o reconhecimento via TLRs nos modelos experimentais com *T. cruzi* foi principalmente explorado em macrófagos e células dendríticas, estas últimas por serem as principais células apresentadoras descritas (Alba Soto, Mirkin et al. 2003; Rodriguez, Carlier et al. 2012).

Nossos dados mostram que as células B, especialmente B1, podem ser ativadas por componentes do DNA do *T. cruzi* (CpG's), e que a ativação dessas células é mediada por TLR9, molécula endossomal que interage com CpGs não metilados. Uma vez ativadas, algumas populações de células B produzem citocinas pró-inflamatórias, mas especialmente secretam IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Figura 11). Outro aspecto importante da ativação das células B1 via TLRs na infecção, é a capacidade dessas células de tornarem-se células plasmáticas e secretarem rapidamente anticorpos no início da infecção, independente dos sinais via BCR (Martin and Kearney 2000). Em concordância, também mostramos que as células B secretaram IgM após ativação com oligonucleotídeos de protozoário e que essa resposta ocorreu entre o primeiro e o terceiro dia após o estímulo *in vitro* (Figura 9).

5.3 Citocinas pró-inflamatórias e seus efeitos em células B

Devido aos baixos níveis de TNF- α e IL-6 produzidos por B, é razoável sugerir que essas citocinas tenham principalmente um papel autócrino, mas talvez parácrino. De fato, foi publicado que o TNF- α e o IL-6 produzido por essas células, interferem com a sua produção de anticorpos. Mais especificamente, o TNF- α tem um efeito autócrino, pois estimula a produção de IL-6, que por sua vez contribui para a maturação de B e a produção de IgG (Rieckmann, D'Alessandro et al. 1991).

Aqui nós demonstramos que as células B estimuladas *in vitro* com CpGs produzem muito menos TNF- α e IL-6 que macrófagos, ambas purificadas da cavidade peritoneal. Dessa forma, o papel parácrino das células B da cavidade peritoneal para essas citocinas deve ser muito pequeno, restando apenas seu caráter autócrino. Isso nos leva a sugerir que a atividade parácrina das citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos da cavidade peritoneal ativadas podem influenciar as células B quanto ao seu processo de maturação e secreção de

anticorpos, especialmente as células B1, por serem T independentes e representarem grande parte das células totais neste sítio.

Em contrapartida, a proporção e o número absoluto de células B no baço são muito maiores do que os de macrófagos, o que pode indicar um importante papel das células B através da secreção de citocinas pró-inflamatórias neste local. Portanto as células B devem colaborar com o crescimento e a diferenciação das células T e B através da produção de IL-6 e com o papel inflamatório bem conhecido das células T, grande produtora de TNF- α .

5.4 Papel da IL-10 na infecção por protozoários

Camundongos incapazes de produzir IL-10, quando infectados com *Toxoplasma gondii*, morrem devido à exarcebação da resposta inflamatória, caracterizada por altos níveis de TNF- α , IL-12 e IFN- γ (Gazzinelli, Wysocka et al. 1996). Estudo recente também mostrou um mecanismo que leva a produção de IL-10 por células B na malária, mas com destaque principalmente no início da infecção (Freitas do Rosario, Lamb et al. 2012). Também foi descrito a importância de IL-10 como fator de proteção contra miocardite e controle do *Trypanosoma cruzi* em diferentes modelos de camundongos, os quais apresentam susceptibilidade distinta a infecção (Roffe, Rothfuchs et al. 2012). Nesta última citação, foi demonstrada a importância de células T-CD8+ e T-CD4+ como reguladores da inflamação. A maioria dos trabalhos, como esse, destacam o papel das células T, mas não avalia a participação das células B nesses processos. Além disso, como descrito nas referências acima, as descrições priorizam o papel regulatório das células do sistema imune em uma fase mais tardia da infecção.

A cavidade peritoneal é um local muito utilizado como via de inoculação do parasito em modelos experimentais (Pinto, Ribeiro et al. 1986; Bahia, Tafuri et al. 2002), portanto é um sítio interessante para se explorar as primeiras respostas imunológicas. Neste sítio, as células B1 são predominantes em número, o que justifica o estudo do papel dessas células na imunidade inata utilizando a via i.p de infecção. Também devido a grande proporção de células B presentes no baço e a já descrita capacidade destas como produtoras de citocinas (Lund 2008), sua

contribuição no papel regulatório durante a infecção por *T. cruzi* também merece nossa atenção.

Nós identificamos células B produtoras de IL-10 quando ativadas por agonistas de receptores da imunidade inata (Figuras 11 e 12). Essas células podem ser a primeira fonte de IL-10 durante a infecção por *T. cruzi*, podendo participar no controle da resposta inflamatória antes mesmo da ativação dos mecanismos da imunidade adquirida. Além disso, a IL-10 e a IL-6 produzidas por essas células pode também ter um efeito autócrino e parácrino, promovendo a proliferação e diferenciação das células B em células plasmáticas (Montes, Acosta-Rodriguez et al. 2006).

Também identificamos linfócitos B produtores de IL-10 no baço de camundongos infectados com *T. cruzi*. Esses linfócitos expressam CD5 em sua superfície, que segundo a tabela 2 deste trabalho, poderiam ser classificados como B1a. O trabalho original do qual esta tabela foi adaptada, caracteriza as células B regulatórias (Bregs) como positivas para expressão de CD5 (Baumgarth 2011). No entanto, as Bregs não foram caracterizadas de forma conclusiva, com marcadores específicos que as identifiquem separadamente. Uma proposta atual sugere que as células B produtoras de IL-10 (regulatórias) podem ser divididas em pelo menos três classes: “Adaptative Bregs”, compostas pelas células B ativadas via CD40 e BCR; “Innate Bregs”, compostas por linfócitos B1 e MZB ativados via TLRs e outros componentes da imunidade inata; e “Immature Bregs”, representadas por células B dependentes apenas da ativação por CD40 (Zhang 2013). Levando em consideração essa classificação, nós podemos dizer que as células B1a, principal foco do nosso trabalho, consistem em células B regulatórias inatas.

Nossos resultados nos motivaram a entender melhor o papel regulatório dos linfócitos B no percurso da infecção e abriram um novo campo de estudo no nosso laboratório, mas principalmente dentro do contexto da imunidade inata, foco do nosso grupo.

5.5 Relação entre os linfócitos B e outras células do sistema imune

Outro importante papel da IL-10 é sua influencia na troca de classe das células B. Células dendríticas pré-ativadas aumentam a expressão de BLyS (BAFF) e APRIL, que associados ao estímulo de IL-10 provocam a troca de classe de IgM para IgG ou

IgA, mecanismo independente da interação CD40-CD40L entre B e T, respectivamente (Litinskiy, Nardelli et al. 2002).

Células de Kupffer e macrófagos ativados são bons produtores de IL-18, citocina que juntamente com IL-12 e estímulo com anti-CD40 induzem a produção de IFN- γ pelas células B inibindo assim a produção de IgE. Isso mostra que as células B interagem e se correlacionam com várias células ou mesmo vários produtos das mesmas, o que pode modificar seu fenótipo (Yoshimoto, Okamura et al. 1997). A produção de IFN- γ pelas células T pode também ser amplificada pelas células B na presença de TNF- α (Menard, Minns et al. 2007).

As células B podem influenciar a resposta imune celular como APC e produtora de citocinas e quimiocinas. Tem sido mostrado que a função APC das células B pode ser importante para indução de uma ótima resposta vacinal em camundongos imunizados com CpG e transialidase de *T. cruzi*, uma enzima envolvida na infectividade do parasito (Hoft, Eickhoff et al. 2007). Além disso, camundongos deficientes de células B, quando infectados com *T. cruzi*, possuem reduzido número de células T-CD8+ e uma deficiência na geração de células de memória central ou efectoras.

Fica claro que as células B podem influenciar várias células do sistema imune seja pelo seu papel humoral, regulatório ou atuando como APC. Várias células também interferem na resposta de B tanto pela secreção de citocinas quanto por sinais de contato direto. Isso reforça a idéia de que as citocinas produzidas por B tem um amplo papel, principalmente autocrino ou parácrino, mas a resposta humoral continua sendo o mais importante mecanismo imune dessas células.

Nós avaliamos comparativamente os macrófagos e os linfócitos B da cavidade peritoneal, quanto à produção de citocinas destas células (Figura 11). Identificamos o poderoso papel inflamatório dos macrófagos da cavidade peritoneal, mas também o papel regulatório dos linfócitos B1. Aqui pode existir uma relação entre essas células, em que os linfócitos B1 do PerC seriam moduladoras da inflamação, por regular a produção de TNF- α e IL-6 pelos macrófagos da cavidade peritoneal. Essa idéia poderia ser justificada pelo grande número de macrófagos neste sítio capazes de produzir níveis muito altos dessas citocinas, o que exigiria algum controle para proteger o local, que está em contato com o intestino e muitos órgãos. Além disso, as células B são predominantes neste ambiente e são descritas como importantes

produtoras de IgA no intestino (Westlund, Livingston et al. 2012; Yanagibashi, Hosono et al. 2013).

5.6 Caráter multifuncional dos linfócitos B

Os Linfócitos B são capazes de desempenhar uma ampla quantidade de funções na resposta imune. Algumas publicações indicaram a atividade fagocítica das células B1 de camundongos para alguns microorganismos e algumas partículas (Souwer, Griekspoor et al. 2009; Gao, Ma et al. 2012). Essa atividade fagocítica foi também descrita em peixes e anfíbios (Li, Barreda et al. 2006), o que suporta a idéia de que essa característica dos linfócitos B não é recente.

As células B expressam altos níveis de MHC-II constitutivamente e seu papel na apresentação de antígenos é conhecida há muitos anos (Bottomly and Janeway 1989). Alguns trabalhos enfatizam o papel de B como APC, pois avaliam sua importância na geração de células T-CD4 efetoras, mecanismos que dependem da expressão de MHC-II (Noorchashm, Reed et al. 2006; Archambault, Carrero et al. 2013).

A imunidade humoral é principalmente construída pelos linfócitos B. Os linfócitos B podem diferenciar-se em células plasmáticas e secretar anticorpos, característica exclusiva destas células. Adicionalmente, as células B podem ainda se diferenciar em células de memória capazes de produzir anticorpos de alta afinidade em resposta a reinfecções. Devido a tais características, os linfócitos B são muito explorados na confecção de anticorpos monoclonais (Mi, Yan et al. 2007; Shim, Choi et al. 2007), ferramenta essencial na pesquisa.

O papel regulatório de B também tem sido estudado tanto em humanos como em camundongos (Iwata, Matsushita et al. 2011). Aqui nós avaliamos principalmente o perfil regulatório de algumas populações de linfócitos B provenientes da cavidade do peritônio. Todavia, existem vários aspectos ainda a serem estudados durante a infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, principalmente em relação aos papéis não humorais das células B. Assim nós abrimos perspectivas de estudo quanto ao caráter regulatório desses linfócitos e futuramente avaliaremos mais profundamente os mecanismos envolvidos nesse papel de B durante a infecção.

6. CONCLUSÕES

Os macrófagos são ativados por CpGs de *Trypanosoma cruzi* e rapidamente produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, que no local da infecção pode causar uma forte inflamação. As células B1 respondem também de forma rápida a agonistas de TLRs, como os CpGs do parasito, o que leva a produção de IL-10 por esses linfócitos. A IL-10 produzida pelas células B1, especialmente B1a, deve regular o processo inflamatório provocado inicialmente pelos macrófagos ativados, mantendo o equilíbrio da resposta imunológica no local da infecção. Os linfócitos B também secretam anticorpos do tipo IgM quando estimulados com os oligonucleotídeos de *T. Cruzi* que servem como uma primeira linha de combate humoral contra o parasito. Mas a secreção de IgM ocorre depois da secreção de citocinas pelas células B, indicativo de que a produção de TNF- α , IL-6 e IL-10 devem interferir com a produção e secreção de anticorpos pelas células B. Finalmente, é importante ressaltar que a detecção de células B produtoras de IL-10 no baço, onde estas são numerosas, indica que seu papel regulatório se estende a uma fase mais tardia da infecção, em que estão envolvidos componentes da resposta imune mediada por células T, e provavelmente tem grande relevância no controle da inflamação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-787.

Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Alba Soto, C. D., G. A. Mirkin, et al. (2003). "Trypanosoma cruzi infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner." Infect Immun **71**(3): 1194-1199.

Almeida, I. C. and R. T. Gazzinelli (2001). "Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses." J Leukoc Biol **70**(4): 467-477.

Archambault, A. S., J. A. Carrero, et al. (2013). "Cutting Edge: Conditional MHC Class II Expression Reveals a Limited Role for B Cell Antigen Presentation in Primary and Secondary CD4 T Cell Responses." J Immunol **191**(2): 545-550.

Bafica, A., H. C. Santiago, et al. (2006). "Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection." J Immunol **177**(6): 3515-3519.

Bahia, M. T., W. L. Tafuri, et al. (2002). "Comparison of Trypanosoma cruzi infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes." Rev Soc Bras Med Trop **35**(4): 339-345.

Barbosa, R. P., B. G. Filho, et al. (2013). "Vaccination Using Recombinants Influenza and Adenoviruses Encoding Amastigote Surface Protein-2 Are Highly Effective on Protection against Trypanosoma cruzi Infection." PLoS One **8**(4): e61795.

Barr, T. A., S. Brown, et al. (2007). "TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells." Eur J Immunol **37**(11): 3040-3053.

Bartholomeu, D. C., C. Ropert, et al. (2008). "Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi." J Immunol **181**(2): 1333-1344.

Baumgarth, N. (2004). "B-cell immunophenotyping." Methods Cell Biol **75**: 643-662.

Baumgarth, N. (2011). "The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions." Nat Rev Immunol **11**(1): 34-46.

Bermejo, D. A., M. C. Amezcua Vesely, et al. (2011). "Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies." Immunology **132**(1): 123-133.

Bottomly, K. and C. A. Janeway, Jr. (1989). "Antigen presentation by B cells." Nature **337**(6202): 24.

Campos, M. A., I. C. Almeida, et al. (2001). "Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite." J Immunol **167**(1): 416-423.

Chen, M., F. Aosai, et al. (2000). "Anti-HSP70 autoantibody formation by B-1 cells in Toxoplasma gondii-infected mice." Infect Immun **68**(9): 4893-4899.

Coura, J. R. and J. C. Dias (2009). "Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 31-40.

Dutra, W. O., O. A. Martins-Filho, et al. (1996). "Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes." Scand J Immunol **43**(1): 88-93.

Erickson, L. D., T. M. Foy, et al. (2001). "Murine B1 B cells require IL-5 for optimal T cell-dependent activation." J Immunol **166**(3): 1531-1539.

Flaishon, L., S. Becker-Herman, et al. (2004). "Expression of the chemokine receptor CCR2 on immature B cells negatively regulates their cytoskeletal rearrangement and migration." Blood **104**(4): 933-941.

Foy, T. M. and T. J. Waldschmidt (1993). "Switching capacity of Fc epsilon RII-positive and -negative murine B cells." Eur J Immunol **23**(12): 3208-3216.

Freitas do Rosario, A. P., T. Lamb, et al. (2012). "IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection." J Immunol **188**(3): 1178-1190.

Gao, J., X. Ma, et al. (2012). "Novel functions of murine B1 cells: active phagocytic and microbicidal abilities." Eur J Immunol **42**(4): 982-992.

Garg, N. and R. L. Tarleton (2002). "Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in Trypanosoma cruzi infection." Infect Immun **70**(10): 5547-5555.

Gazzinelli, R. T. and E. Y. Denkers (2006). "Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism." Nat Rev Immunol **6**(12): 895-906.

Gazzinelli, R. T., L. M. Galvao, et al. (1988). "Anti-Trypanosoma cruzi and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment." J Clin Microbiol **26**(9): 1795-1800.

Gazzinelli, R. T., L. M. Galvao, et al. (1993). "Use of Trypanosoma cruzi purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas' disease." Am J Trop Med Hyg **49**(5): 625-635.

Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, et al. (1996). "In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with Toxoplasma gondii succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha." J Immunol **157**(2): 798-805.

Genestier, L., M. Taillardet, et al. (2007). "TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses." J Immunol **178**(12): 7779-7786.

Gravina, H. D., L. Antonelli, et al. (2013). "Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with Trypanosoma cruzi." PLoS One **8**(5): e63100.

Gupta, S., X. Wan, et al. (2013). "Antigenicity and diagnostic potential of vaccine candidates in human Chagas disease." PLoS Negl Trop Dis **7**(1): e2018.

Gururajan, M., J. Jacob, et al. (2007). "Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets." PLoS One **2**(9): e863.

Harris, D. P., L. Haynes, et al. (2000). "Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells." Nat Immunol **1**(6): 475-482.

Haughton, G., L. W. Arnold, et al. (1993). "B-1 cells are made, not born." Immunol Today **14**(2): 84-87; discussion 87-91.

Heiser, R. A., C. M. Snyder, et al. (2011). "Aborted germinal center reactions and B cell memory by follicular T cells specific for a B cell receptor V region peptide." J Immunol **187**(1): 212-221.

Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature **408**(6813): 740-745.

Herzenberg, L. A. (1989). "Toward a layered immune system." Cell **59**(6): 953-954.

Hoerauf, A., W. Solbach, et al. (1994). "The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice." Int Immunol **6**(8): 1117-1124.

Hoff, D. F., C. S. Eickhoff, et al. (2007). "Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic trypanosoma cruzi immunity involving CD8+ CTL and B cell-mediated cross-priming." J Immunol **179**(10): 6889-6900.

Iwata, Y., T. Matsushita, et al. (2011). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." Blood **117**(2): 530-541.

Junqueira, C., A. T. Guerrero, et al. (2012). "Trypanosoma cruzi adjuvants potentiate T cell-mediated immunity induced by a NY-ESO-1 based antitumor vaccine." PLoS One **7**(5): e36245.

Katsenelson, N., S. Kanswal, et al. (2007). "Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion." Eur J Immunol **37**(7): 1785-1795.

Kayama, H. and K. Takeda (2010). "The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection." Microbes Infect **12**(7): 511-517.

Kearney, J. F. (2005). "Innate-like B cells." Springer Semin Immunopathol **26**(4): 377-383.

Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." Annu Rev Immunol **20**: 709-760.

Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." Nature **374**(6522): 546-549.

Lalor, P. A. and G. Morahan (1990). "The peritoneal Ly-1 (CD5) B cell repertoire is unique among murine B cell repertoires." Eur J Immunol **20**(3): 485-492.

Leguizamon, M. S., O. E. Campetella, et al. (1994). "Mice infected with Trypanosoma cruzi produce antibodies against the enzymatic domain of trans-sialidase that inhibit its activity." Infect Immun **62**(8): 3441-3446.

Li, J., D. R. Barreda, et al. (2006). "B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities." Nat Immunol **7**(10): 1116-1124.

Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL." Nat Immunol **3**(9): 822-829.

Lund, F. E. (2008). "Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity." Curr Opin Immunol **20**(3): 332-338.

Magez, S., A. Schwegmann, et al. (2008). "The role of B-cells and IgM antibodies in parasitemia, anemia, and VSG switching in *Trypanosoma brucei*-infected mice." PLoS Pathog **4**(8): e1000122.

Majumder, S. and F. Kierszenbaum (1996). "Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*-induced down-regulation of lymphocyte function. Inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor gamma (p64IL-2R) and beta (p70IL-2R) chain molecules in activated normal human lymphocytes." J Immunol **156**(10): 3866-3874.

Martin, F. and J. F. Kearney (2000). "B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory"." Immunol Rev **175**: 70-79.

Matsushita, T., M. Horikawa, et al. (2010). "Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis." J Immunol **185**(4): 2240-2252.

Menard, L. C., L. A. Minns, et al. (2007). "B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism." J Immunol **179**(7): 4857-4866.

Merino, M. C., C. L. Montes, et al. (2010). "Peritoneum from *Trypanosoma cruzi*-infected mice is a homing site of Syndecan-1 neg plasma cells which mainly provide non-parasite-specific antibodies." Int Immunol **22**(5): 399-410.

Meyer-Bahlburg, A., A. D. Bandaranayake, et al. (2009). "Reduced c-myc expression levels limit follicular mature B cell cycling in response to TLR signals." J Immunol **182**(7): 4065-4075.

Mi, J. B., J. Yan, et al. (2007). "Production and characterization of monoclonal antibody against recombinant human erythropoietin." Biomed Environ Sci **20**(3): 184-188.

Minoprio, P., A. Coutinho, et al. (1991). "Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease." Int Immunol **3**(5): 427-433.

Minoprio, P., M. C. el Cheikh, et al. (1993). "Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent." J Immunol **151**(8): 4200-4208.

Moncayo, A. and A. C. Silveira (2009). "Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy." Mem Inst Oswaldo Cruz **104 Suppl 1**: 17-30.

Montecino-Rodriguez, E., H. Leathers, et al. (2006). "Identification of a B-1 B cell-specified progenitor." Nat Immunol **7**(3): 293-301.

Montes, C. L., E. V. Acosta-Rodriguez, et al. (2006). "A Trypanosoma cruzi antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells." Eur J Immunol **36**(6): 1474-1485.

Morel, C. M. and J. Lazdins (2003). "Chagas disease." Nat Rev Microbiol **1**(1): 14-15.

Nogueira, R. T., A. R. Nogueira, et al. (2013). "Recombinant yellow fever viruses elicit CD8+ T cell responses and protective immunity against Trypanosoma cruzi." PLoS One **8**(3): e59347.

Noorchashm, H., A. J. Reed, et al. (2006). "B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection." J Immunol **177**(11): 7715-7722.

O'Garra, A., G. Stapleton, et al. (1990). "Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10." Int Immunol **2**(9): 821-832.

O'Neill, L. A. and A. G. Bowie (2007). "The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **7**(5): 353-364.

Peng, S. L. (2005). "Signaling in B cells via Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **17**(3): 230-236.

Pinto, F. H., R. D. Ribeiro, et al. (1986). "[Comparative study of the behavior of infection in mice, through subcutaneous and intraperitoneal inoculation, using 2 strains of Trypanosoma cruzi]." Rev Saude Publica **20**(2): 133-140.

Pistoia, V. (1997). "Production of cytokines by human B cells in health and disease." Immunol Today **18**(7): 343-350.

Rawlings, D. J., M. A. Schwartz, et al. (2012). "Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors." Nat Rev Immunol **12**(4): 282-294.

Rieckmann, P., F. D'Alessandro, et al. (1991). "IL-6 and tumor necrosis factor-alpha. Autocrine and paracrine cytokines involved in B cell function." J Immunol **146**(10): 3462-3468.

Rodriguez, P., Y. Carlier, et al. (2012). "Activation of cord blood myeloid dendritic cells by Trypanosoma cruzi and parasite-specific antibodies, proliferation of CD8+ T cells, and production of IFN-gamma." Med Microbiol Immunol **201**(2): 157-169.

Roffe, E., A. G. Rothfuchs, et al. (2012). "IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of Trypanosoma cruzi infection." J Immunol **188**(2): 649-660.

Ropert, C., M. Closel, et al. (2003). "Inhibition of a p38/stress-activated protein kinase-2-dependent phosphatase restores function of IL-1 receptor-associate kinase-1 and reverses Toll-like receptor 2- and 4-dependent tolerance of macrophages." J Immunol **171**(3): 1456-1465.

Ruprecht, C. R. and A. Lanzavecchia (2006). "Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells." Eur J Immunol **36**(4): 810-816.

Shim, W. B., J. G. Choi, et al. (2007). "Production of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and its application to immunochromatography strip test." J Microbiol Biotechnol **17**(7): 1152-1161.

Souwer, Y., A. Griekspoor, et al. (2009). "B cell receptor-mediated internalization of salmonella: a novel pathway for autonomous B cell activation and antibody production." J Immunol **182**(12): 7473-7481.

Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-376.

Vinuesa, C. G. and P. P. Chang (2013). "Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses." Nat Immunol **14**(2): 119-126.

Waldschmidt, T. J., F. G. Kroese, et al. (1991). "The expression of B cell surface receptors. III. The murine low-affinity IgE Fc receptor is not expressed on Ly 1 or 'Ly 1-like' B cells." Int Immunol **3**(4): 305-315.

Wang, H. and S. H. Clarke (2004). "Positive selection focuses the VH12 B-cell repertoire towards a single B1 specificity with survival function." Immunol Rev **197**: 51-59.

Watanabe, R., N. Ishiura, et al. (2010). "Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity." J Immunol **184**(9): 4801-4809.

Wells, S. M., A. B. Kantor, et al. (1994). "CD43 (S7) expression identifies peripheral B cell subsets." J Immunol **153**(12): 5503-5515.

Westlund, J., M. Livingston, et al. (2012). "CD47-deficient mice have decreased production of intestinal IgA following oral immunization but a maintained capacity to induce oral tolerance." Immunology **135**(3): 236-244.

WHO (2010). World Malaria Report. World Health Organization.

Won, W. J. and J. F. Kearney (2002). "CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice." J Immunol **168**(11): 5605-5611.

Yanagibashi, T., A. Hosono, et al. (2013). "IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA+ B cells." *Immunobiology* **218**(4): 645-651.

Yoshida, N., J. E. Araya, et al. (1993). "Trypanosoma cruzi: antibody production and T cell response induced by stage-specific surface glycoproteins purified from metacyclic trypomastigotes." *Exp Parasitol* **77**(4): 405-413.

Yoshimoto, T., H. Okamura, et al. (1997). "Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3948-3953.

Zhang, X. (2013). "Regulatory functions of innate-like B cells." *Cell Mol Immunol* **10**(2): 113-121.