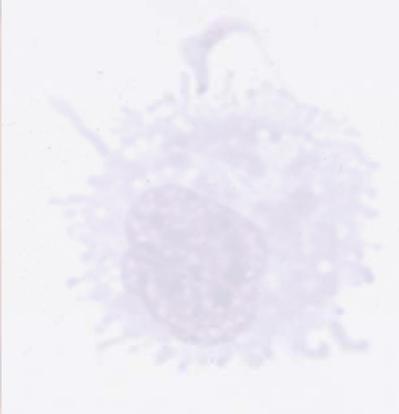
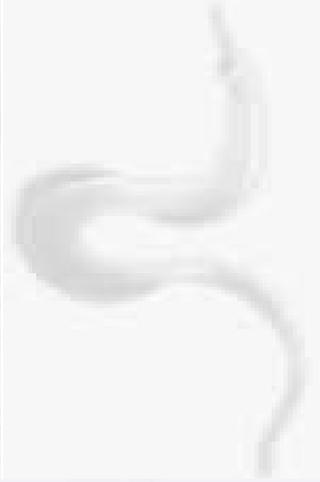
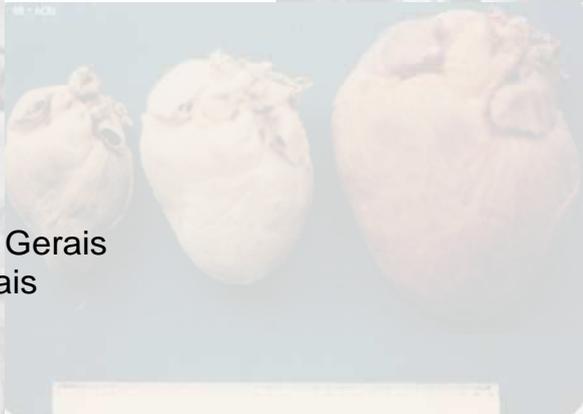
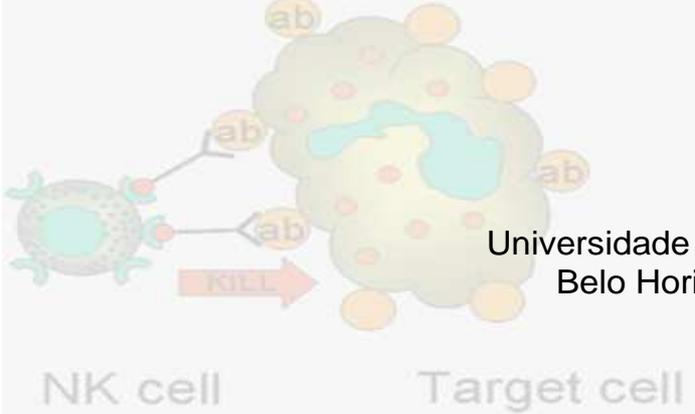
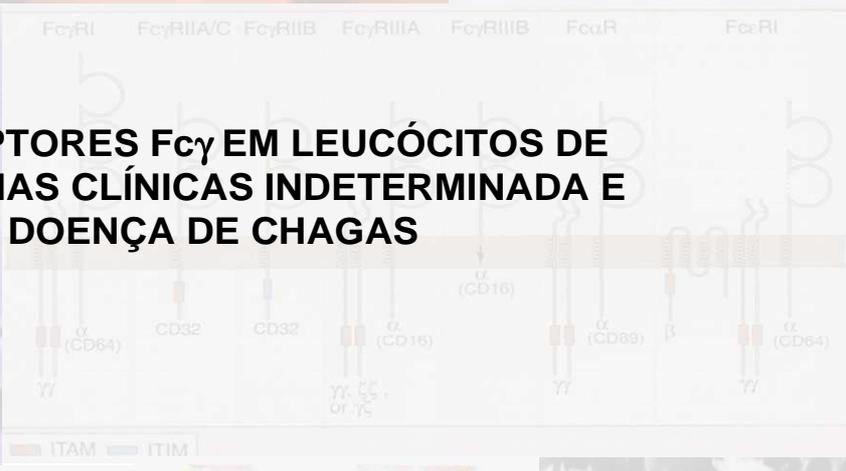


PAULA SOUZA LAGE



EXPRESSÃO DE RECEPTORES Fcγ EM LEUCÓCITOS DE PORTADORES DAS FORMAS CLÍNICAS INDETERMINADA E CARDÍACA DA DOENÇA DE CHAGAS



Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte- Minas Gerais
2008

PAULA SOUZA LAGE

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES Fc γ EM LEUCÓCITOS DE PORTADORES
DAS FORMAS CLÍNICAS INDETERMINADA E CARDÍACA DA DOENÇA DE
CHAGAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia
Área de Concentração: Patologia Geral

Orientador: Dra. Silvana Maria Elói Santos

Co-Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

PAULA SOUZA LAGE

Expressão de receptores Fcγ em leucócitos de portadores das formas clínicas
indeterminada e cardíaca da doença de chagas

Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Silvana Maria Elói Santos (Orientador-Presidente)

Dra. Mariléia Chaves Andrade (Membro titular)

Dr. André Talvani (Membro titular)

Dr. Renato Sathler Avelar (Membro suplente)

Fevereiro de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Professor Ronaldo Tadêu Pena

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Professor Jaime Arturo Ramírez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Professor Francisco José Penna

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
Área de Concentração em Patologia Geral

COORDENADOR: Professor Geovani Dantas Cassali

MEMBROS DO COLEGIADO:

Professor Anílton César Vasconcelos

Professor Edilberto Nogueira Mendes

Professora Helenice Gobbi

Professor Wagner Luiz Tafuri

Enio Ferreira (Representante Discente Titular)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Instituto de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ, sob a orientação da doutora Silvana Maria Elói Santos e do doutor Olindo Assis Martins Filho.

COLABORADORES

Danielle Marquete Vitelli Avelar¹

Dr. João Carlos Pinto Dias²

1-Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração - Instituto de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

2- Laboratório de Triatomíneos - Instituto de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

SUPORTE FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Instituto de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ

*D*edico esse trabalho aos meus pais, pelo incansável estímulo, preocupação, paciência e acima de tudo pelo amor.

A Silvana Elói pelos ensinamentos, apoio, incentivo e confiança.

*A*os amigos Anderson Barnabé e Márcio Sobreira pelo apoio, amizade e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

Aos meus pais pelo amor, paciência e por terem me ensinado a honestidade, a humildade, a jamais desistir e a dar o melhor de mim em tudo que faço.

Aos meus irmãos, Roberta, Malu, Tiago e Daniel, pelos momentos de descontração e por terem feito parte dessa jornada.

À doutora Silvana Maria Elói Santos não só pela orientação, mas também pelos ensinamentos profissionais e pessoais, pela sua paciência, confiança e amizade.

Ao doutor Olindo Assis Martins Filho por seus ensinamentos.

À Danielle Marquete pela colaboração, sugestões e convivência.

Ao Renato que sempre esteve disposto a contribuir com meu crescimento profissional.

Ao Anderson por ser um grande amigo, pela colaboração, pelas sugestões, pela atenção, pela disponibilidade e pelo carinho.

Ao Eduardo pelo carinho, apoio, atenção e paciência.

Aos amigos da Pós –Graduação: Bia, Frank, Keyla, Roberta, Marcinha, Vanessa, Jerusa, Éder, Luciana, Juliana, Angélica, pela amizade, pelo convívio, por estarem sempre por perto nos momentos mais difíceis.

Aos amigos do laboratório de Biomarcadores-CPqRR: Márcio, Roberta Félix, Luciana, Roberta Carvalho, Lisiane, Ana Paula, Maria Luiza, Jordana, Cíntia, Luana, Mariana, Vanessa Peruhype, Andréa e Juliana pela convivência, pelos momentos de descontração, pelo apoio e amizade.

À Júlia e ao Matheus pela amizade, pelos momentos de distração e confiança.

À Letícia e ao José Oswaldo do laboratório Central da UFMG, por estarem sempre disponíveis.

À Bia pela disponibilidade do “FACS” no Hemominas e pelas conversas.

Ao Segemar pela ajuda nas pesquisas bibliográficas.

Ao Orlando pelo carinho, atenção, ensinamentos e disponibilidade.

Ao Dr. João Carlos pelo empenho na seleção dos pacientes.

À Valéria e Marília, secretárias do departamento de Propedêutica Complementar pela disponibilidade.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Patologia.

À tia Sandra, Evelyn, Rafa e Andrey pelo amor, confiança e compreensão.

À Dani e a Maiara, pelo convívio, pela paciência e compreensão, pelo carinho, pelas festas, sambas...

À Gaby e a Lorena pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao Weder pelo apoio, paciência e convívio.

Ao Leonardo Rocha e a Vera pelo carinho, admiração e pelo convívio.

À Helena e Telma pela convivência, carinho e amizade.

À Lita pelo amor, pela convivência, orações e amizade.

Ao Zé Du pela amizade, estímulo, conversa, convívio e momentos de laser.

À Daniele, ao Vinícius e a Francine pela amizade, paciência e compreensão.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Seja fiel no cumprimento de todos os seus deveres. Execute com capricho e amor todas as tarefas que recebe, embora pareçam insignificantes. Qualquer coisa que esteja fazendo, por menor que seja, é um passo à frente em seu progresso. Realize suas tarefas todas, como se delas dependesse - como de fato depende - todo o seu futuro.

Tsai Chih Chung

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xx
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO	11
PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS.....	13
I-PACIENTES.....	14
II – MATERIAL E MÉTODOS.....	15
1 – Análise do perfil de imunoglobulinas séricas anti- <i>T cruzi</i>	15
1.1 – Obtenção de formas tripomastigotas.....	15
1.2 – Ensaio de detecção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i>	16
1.3 – Análise de parasitos fluorescentes positivos – PFP.....	17
2 – Análise do padrão de expressão de FcγR.....	19
2.1- Contexto Ex-vivo.....	19
2.2 - Frente à estimulação antígeno-específica.....	20
2.2.1 – Preparação de antígeno solúvel.....	20
2.2.2 – Imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico após estimulação antígeno específica.....	22
2.3 - Estratégias de análise da Intensidade Média de Fluorescência.....	22
2.3.1 – Análise da IMF de FcγR em neutrófilos.....	22
2.3.2 – Análise da IMF de FcγR em monócitos.....	23
2.3.3 – Análise da IMF de FcγR em linfócitos totais.....	24
2.3.4 – Análise da IMF de FcγR em linfócitos B.....	25
2.3.5 – Cálculo da Capacidade Total de Fluorescência.....	26
2.3.6 – Cálculo da razão Cultura estimulada/Cultura controle.....	26
3- Análise estatística.....	26
RESULTADOS.....	28
1-Estudo da reatividade de IgG1 anti-formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> no soro de pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas, através da pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo	29
1.1- Reatividade de anticorpos da classe IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas (FC-ALTA) do <i>Trypanosoma cruzi</i> em soros individuais de pacientes	

portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas.....	30
2-Estudo da expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) na superfície de neutrófilos, monócitos e linfócitos no contexto ex-vivo.....	33
2.1- Estudo da expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) na superfície de neutrófilos, através da Capacidade Total de Fluorescência (CTF).....	34
2.2 – Estudo da expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) na superfície de monócitos, através da Capacidade Total de Fluorescência (CTF).....	35
2.3 – Estudo da expressão dos receptores FcγRIII (CD16) e FcγRII (CD32) em linfócitos, através da Capacidade Total de Fluorescência (CTF).....	37
3-Estudo do impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) em neutrófilos após ensaios de cultura breve in vitro.....	39
3.1- Estudo do impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) em neutrófilos após ensaios de cultura breve in vitro.....	40
3.2- Estudo do impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) em monócitos após ensaios de cultura breve in vitro.....	41
3.3 - Estudo do impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores FcγRIII (CD16) e FcγRII (CD32) em linfócitos totais e linfócitos B, respectivamente, após ensaios de cultura breve in vitro.....	42
4-Estudo da correlação entre a reatividade de IgG1 anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> no soro de pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas e razão CE/CC de CTF dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) na superfície de neutrófilos, monócitos e linfócitos.....	44
4.1-Associação do padrão de expressão de FcγR em leucócitos circulantes com o perfil de imunoglobulinas séricas anti- <i>T. cruzi</i>	45
SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA I - População de estudo.....	15
TABELA II - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e moléculas de superfície.....	20
TABELA III - Modelo para o cálculo da Capacidade Total de Fluorescência....	25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Interseção do perfil de expressão de receptores Fc γ entre pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da fase crônica da doença de Chagas.....	10
FIGURA 2 - Seqüência de passos utilizados para as análises da reatividade de IgG anti-tripomastigotas do <i>T. cruzi</i> por citometria de fluxo.....	18
FIGURA 3 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão de receptores Fc γ R (CD64, CD32 e CD16) na população de neutrófilos.....	22
FIGURA 4 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão do receptor Fc γ R (CCD64, CD32 e CD16) na população de monócitos.....	23
FIGURA 5 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão do receptor Fc γ RIII (CD16) na população de linfócitos totais.....	24
FIGURA 6 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão do receptor Fc γ RII (CD32) na população de linfócitos B.....	25
FIGURA 7 - Curva de titulação de FC-ALTA IgG1, em PFP, de soros individuais de pacientes dos grupos não infectados, indeterminados e cardíacos da doença de Chagas.....	30
FIGURA 8 – Reatividade de IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas do <i>T. cruzi</i> em soro de pacientes chagásicos.....	31

FIGURA 9 – Expressão, em CTF, de CD16 , CD32 e CD64 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas.....	34
FIGURA 10 - Expressão, em CTF, de CD16, CD32 e CD64 em monócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas.....	35
FIGURA 11 - Expressão, em CTF, de CD16 em linfócitos totais e CD32 em linfócitos B do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas.....	37
FIGURA 12 – Razão da CTF da cultura estimulada/CTF da cultura controle na expressão de CD16, CD32 e CD64 em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas.....	40
FIGURA 13 - Razão da CTF da cultura estimulada/CTF da cultura controle na expressão de CD16, CD32 e CD64 em monócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas.....	41
FIGURA 14 – Razão da CTF da cultura estimulada/CTF da cultura controle na expressão de CD16, em linfócitos totais, e CD32 em linfócitos B do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas.....	42
FIGURA 15 – Análise de correlação entre os valores de PPFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD16 (CTF) em neutrófilos no sangue periférico dos indivíduos portadores da doença de Chagas.....	44
FIGURA 16 – Análise de correlação entre os valores de PPFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD32 (CTF) em neutrófilos no sangue periférico dos indivíduos portadores da doença de Chagas.....	45
FIGURA 17 – Análise de correlação entre os valores de PPFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD32 (CTF) em monócitos no sangue periférico dos indivíduos portadores da doença de Chagas.....	45
FIGURA 18 – Análise de correlação entre os valores de PPFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD16 (CTF) em linfócitos totais no	

sangue periférico dos indivíduos portadores da doença de Chagas.....	46
FIGURA 19 – Variação na expressão de FcγR no contexto ex-vivo e do impacto da estimulação antigênica: CTF em ex-vivo e CTF após estimulação antígeno específica.....	47
FIGURA 20 – Análise de correlação entre os valores de PPFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de FcγRs em neutrófilos, monócitos e linfócitos totais no sangue periférico dos indivíduos portadores da doença de Chagas.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> (Citotoxicidade celular dependente de anticorpos)
AL	Anticorpos líticos
ASC	Anticorpos da sorologia convencional
CARD	Indivíduos portadores da forma clínica cardíaca
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CC	Cultura controle
CE	Cultura estimulada
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Medium</i> (Meio de cultura celular)
DNDi	<i>Drugs for neglected diseases initiative</i> (Drogas para inativação de doenças negligenciadas)
DIG	Indivíduos portadores da forma clínica digestiva
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FC	Fração cristalizável de imunoglobulina
FcγR1	Receptor Fc γ I, também denominado CD64
FcγR2	Receptor Fc γ II, também denominado CD32
FcγR3	Receptor Fc γ III, também denominado CD16
Fcγ	Fração cristalizável de imunoglobulina G
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL1	Canal para leitura da Fluorescência do tipo 1 (FITC)
FL3	Canal para leitura da Fluorescência do tipo 3 (TC)
FSC	<i>Forward Scatter</i> (dispersão frontal)

HAI	Reação de hemaglutinação indireta
HLA-DR	Human leukocyte antigen DR (Antígeno Leucocitário Humano DR)
IC	Imunocomplexo
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG3	Imunoglobulina G subclasse 3
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i> (Seqüência de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina)
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif</i> (Seqüência de inibição de imuno-receptor baseada em tirosina)
IND	Indivíduos portadores da forma clínica indeterminada
NI	Grupo não infectado
NK	Células Natural Killer
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salínico)
PPFP	Percentual de Parasitos Fluorescentes Positivos
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
SBF	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro fetal bovino)
SSC	<i>Side Scatter</i> (dispersão lateral)
TC	TRI-COLOR [®] (terceira cor)

TNF- α Fator de Necrose Tumoral alfa

WHO *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

Introdução: Receptores para Fc de IgG (Fc γ R) são moléculas que atuam na interface da resposta imune celular/humoral e contribuem na ativação e/ou modulação da resposta imune. Em humanos, são descritas três categorias de Fc γ R: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16). Fc γ RI, Fc γ RIIa e RIII ativam a resposta celular, enquanto o RIIb apresenta papel inibitório. Na infecção pelo *T. cruzi*, há poucos estudos em humanos. Estudos prévios demonstraram que pacientes assintomáticos apresentavam maior expressão de CD64 em monócitos e maior frequência de monócitos CD16⁺ (VITELLI *et al.*: 2004).

Objetivo: Avaliar a expressão dos Fc γ Rs no contexto *ex-vivo* e o impacto da estimulação antígeno específica em leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas.

Metodologia: Amostras de sangue periférico foram coletadas de indivíduos não infectados e portadores das formas crônicas indeterminada e cardíaca. Foi realizada imunofenotipagem por citometria de fluxo de leucócitos de sangue periférico. Amostras de sangue também foram cultivadas por 5 horas na presença de antígenos de tripomastigotas e posteriormente imunofenotipadas.

Resultados: Na avaliação *ex-vivo*, neutrófilos do sangue periférico de pacientes infectados apresentaram menor expressão de CD16 e CD32. A estimulação por antígenos derivados do *T. cruzi* induziu queda na expressão de todos Fc γ Rs em neutrófilos de pacientes não infectados e infectados, porém com maior intensidade nos pacientes cardíacos. Na população de monócitos, foi observado aumento na expressão de CD16 nos pacientes assintomáticos e queda de CD32 em pacientes cardíacos. Em linfócitos, a estimulação antigênica induziu queda na expressão de CD16 em todos os grupos, especialmente em pacientes cardíacos.

Conclusões: A estimulação antígeno específica induziu queda na expressão de Fc γ R em diferentes populações de leucócitos. Tal modulação, que poderia ser consequência da internalização ou clareamento do complexo ligante/receptor, foi predominante em pacientes cardíacos, indicando ser elemento importante nos eventos imunológicos observados nas formas clínicas mais graves da infecção.

ABSTRACT

Introduction: Fc receptors for IgG (Fc γ R) are molecules that interface humoral and cellular immunity and contribute to activate and or modulate immune response. In humans, three classes can be distinguished: RI (CD64), RII (CD32); and RIII (CD16). Fc γ RI, RIIa and RIII activate cellular responses upon triggering, whereas RIIb is inhibitory. A balanced action of these opposing signaling systems determines cellular response. In *Trypanosoma cruzi* infection, few studies have been conducted in humans. Previous data showed that asymptomatic patients presented higher expression of CD64 in monocytes and higher frequency of CD16⁺ monocytes (VITELLI *et al.*;2004).

Aims: To evaluate ex-vivo Fc γ R expression and the impact of *T. cruzi* antigens stimulation on Fc γ R expression on different leukocyte populations from chagasic patients.

Methodology: Peripheral blood from infected and non infected individuals was assayed by flow cytometry. Whole blood was also cultured for 5 hours in the presence of trypomastigote antigens before immune staining.

Results: In peripheral leucocytes, we verified lower expression of CD16 on neutrophils and monocytes. *T.cruzi* antigen stimulation induced decrease of all Fc γ Rs expression on neutrophils from non infected and infected individuals, mainly in cardiac patients. In monocytes, an increase of CD16 expression was observed in asymptomatic patients and a decrease in CD32 was verified in cardiac patients. In lymphocytes, antigen stimulation induced consistent decrease of CD16 expression in all groups, especially in cardiac patients.

Conclusions: Antigen stimulation was able to induce robust decay in Fc γ R expression in different leukocyte populations. This down-regulation, predominant in cardiac patients, could be consequent to internalization or cleavage of ligant/receptor complex, acting as important element triggering immunological events related to severe clinical manifestations.

INTRODUÇÃO

Epidemiologia da doença de Chagas

A descoberta da doença de Chagas por Carlos Chagas constitui uma das mais importantes conquistas médicas do Brasil. Em 1909, Carlos Chagas descreveu não só aspectos da biologia do agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*, como a clínica, a epidemiologia e aspectos patológicos da doença (CHAGAS, 1909).

A doença de Chagas ocorre nas Américas principalmente na área que vai do norte do México, a Argentina e sul do Chile, afetando 21 países (WHO, 2002; OPAS 2006). A doença é a terceira enfermidade tropical mais prevalente do planeta, antecedida apenas, pela malária e pela esquistossomose (DNDi, 2006). Atualmente, podem ser identificadas diferentes características regionais em relação à prevalência e à incidência da doença. Em alguns países é observada forte tendência à queda dos números de casos em decorrência das fortes medidas de controle, como na Argentina, Brasil, Chile, Uruguai e Venezuela. Estima-se que 25% da população da América Latina, cerca de 100 milhões de habitantes, encontram-se expostos à infecção (WHO, 2002). Segundo a Organização Pan Americana de Saúde aproximadamente 7.6 milhões de pessoas estariam infectadas com o *Trypanosoma cruzi* na América Latina (OPAS, 2006).

No Brasil a distribuição geográfica é bastante heterogênea. A doença ocorre em aproximadamente 36% do território nacional, atingindo mais de 2.450 municípios (OPAS, 2006). Pressupõe-se a existência de 2-3 milhões de indivíduos infectados, dos quais aproximadamente 60% estariam vivendo em áreas urbanas (DIAS & MACEDO, 2005). As regiões em que há maior ocorrência da moléstia são o sudeste e o noroeste do Rio Grande do Sul, o nordeste de São Paulo, o Triângulo Mineiro, o oeste e nordeste de Minas Gerais, especialmente a área do Vale do Jequitinhonha, o norte, o centro e oeste da Bahia, mais observado no Recôncavo Baiano, também merecendo menção áreas de Goiás, da Paraíba, Pernambuco, Piauí, Céara, Amazônia e sul do Tocantins (COURA *et al.*, 1995; JUNQUEIRA *et al.*, 1999; REY, 2001).

Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*

Na transmissão vetorial da doença de Chagas, a contaminação se dá principalmente pelo contato da pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado com fezes

de triatomíneos contaminados pelo protozoário hemoflagelado *T. cruzi*. Os vetores se infectam quando formas tripomastigotas sangüíneas são ingeridas durante a sucção do sangue do hospedeiro vertebrado infectado. Uma vez no intestino posterior do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas, que se multiplicam por divisão binária e, posteriormente, passam por alterações morfológicas e fisiológicas transformando-se em tripomastigotas metacíclicos no reto do inseto, estando aptas a penetrar em células do hospedeiro mamífero. Estas formas, após o repasto sangüíneo, são eliminadas juntamente com as fezes do vetor, penetrando na pele lesada no local da picada ou em mucosas íntegras, infectando tanto células fagocitárias quanto não fagocitárias, como células epiteliais, tecido subcutâneo, músculo liso, células musculares cardíacas, supra-renal, células de Schwann, ovários e testículos (BRENER Z, SOUZA W, 2000). No interior destas, as formas tripomastigotas se transformam em amastigotas, que conseguem escapar do vacúolo parasitófago para o citoplasma das células hospedeiras, onde se inicia um processo de divisão binária. Após a multiplicação, as formas amastigotas transformam-se em tripomastigotas sanguíneas que rompem a célula, agora na circulação sangüínea, podem infectar novas células ou serem ingeridas por outro inseto vetor dando continuidade ao ciclo biológico do parasito (BRENER *et al.*, 1973; GARCIA *et al.*, 1991; DIAS, 2000).

Quando se estuda os métodos de transmissão pelo *T. cruzi*, observa-se que a principal via é a transmissão vetorial. Entretanto, mecanismo de transmissão, como transfusão sanguínea, transmissão congênita, transplante de órgãos, transmissão oral e acidentes laboratorias, podem ser identificados e apresentam certa constância segundo literaturas (DIAS & MACEDO, 2005). Entre estas possibilidades sem veiculação do triatomíneo, vetor da infecção, tem especial importância epidemiológica a transmissão por transfusão de sangue, que pode fazer com que a doença se dissemine para áreas sem transmissão natural, inclusive para grandes centros populacionais. Também, a transmissão congênita pode representar risco mais duradouro de produção de novos casos e de manutenção da endemia chagásica (SILVEIRA & VINHAES, 1998; DIAS & SCHOFIELD 1999; VINHAES & DIAS, 2000). A transmissão do *Trypanosoma cruzi* por via oral tem caráter habitual no ciclo enzoótico primitivo deste parasito, através da ingestão - por mamíferos suscetíveis - de vetores e reservatórios infectados. No caso do homem, esta

transmissão ocorre de maneira esporádica e circunstancial, através de alimentos contaminados com o parasito, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções (DIAS JCP, 2000; WHO;2002).

Apresentação clínica da infecção

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se por alterações teciduais degenerativas e inflamatórias focais, devido à intensa multiplicação local do parasito (LARANJA et al., 1953). Manifestações sistêmicas, como febre, mal estar, astenia, edema subcutâneo, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia, podem também ser observados (REZENDE & RASSI, 1994). A duração da fase aguda varia geralmente entre 4 a 12 semanas, ao fim das quais o quadro febril e a parasitemia tendem a desaparecer. Em paralelo, descrevem-se também queda nos níveis de imunoglobulinas da classe M e aumento dos níveis de IgG. Esses elementos praticamente definem a transição para fase crônica da doença de Chagas (DIAS & COURA; 1997).

Os indivíduos portadores da infecção crônica podem ser classificados, do ponto de vista clínico, como indeterminados (IND), cardíacos (CARD), digestivos e cardiodigestivos. A forma crônica indeterminada é caracterizada pela presença da infecção, comprovada através de reações sorológicas específicas, porém com ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas e radiológicas. (DIAS & COURA; 1997) Essa é a forma mais freqüente da doença de Chagas detectada na população geral das áreas endêmicas e entre doadores de sangue infectados, possuindo prognóstico favorável em médio e longo prazo, podendo persistir por toda a vida em 40-50% dos casos. Estima-se que cerca de 50-60% dos indivíduos infectados são classificados nessa forma clínica. Os pacientes apresentam-se de forma geral, em bom estado de saúde, desconhecendo, muitas vezes, a presença da infecção. A evolução da forma crônica indeterminada para formas crônicas mais graves é uma possibilidade que ocorre, em geral de maneira insidiosa nas áreas endêmicas, numa proporção aproximada de 2-3% dos casos ao ano (DIAS & COURA, 1997).

Lesões orgânicas que se desenvolvem durante a fase aguda correlacionam-

se temporal e topograficamente com elevada parasitemia e parasitismo tissular em regiões-alvo da infecção (coração, tubo digestivo e sistema nervoso). Quando os níveis de parasitemia e as lesões inflamatórias da fase aguda declinam, uma miocardite focal de baixa intensidade se instala durante a fase indeterminada da doença de Chagas. Após 20-30 anos de infecção, cerca de 20-30% dos indivíduos desenvolvem a forma cardíaca apresentando miocardite, inicialmente focal e discreta, evoluindo incessantemente, com destruição coalescente de fibras cardíacas e fibrose tissular reparativa marcante. A infecção chagásica pode levar ainda a megaformações, principalmente megaesôfago e megacólon, principais manifestações da forma clínica digestiva. Esta forma crônica ocorre em menos de 10% dos indivíduos portadores da doença de Chagas, sendo resultado da destruição das células nervosas do sistema nervoso autônomo, presentes no trato gastrointestinal pelos complexos nervosos intramurais (REZENDE & MOREIRA, 2000). Na fase crônica, o parasito não é encontrado no sangue periférico pelo exame direto, embora seja possível o seu isolamento através do xenodiagnóstico ou hemocultura. Os principais determinantes desta evolução desfavorável ainda não foram definitivamente esclarecidos e devem incluir cepa, carga parasitária, idade, intensidade da infecção aguda, sexo, raça, doenças concomitantes e intercorrentes, estado nutricional, alcoolismo, fatores hereditários, reinfecção e grau de parasitemia, além da resposta imune do hospedeiro (DIAS, 2000).

Interface entre a resposta imune celular e a resposta imune humoral na fisiopatologia da doença de Chagas

Na fisiopatologia da doença de Chagas, é evidente o papel da resposta imune, que compreende mecanismos complexos envolvendo componentes celulares e humorais, tanto na patogenia da infecção quanto na proteção.

Vários estudos destacam, durante a fase aguda, a forte ativação do sistema imune inato, como sendo a primeira linha de defesa contra a invasão do parasito (GAZZINELLI *et al.*, 1998; JANEWAY., 2001). Tanto em casos humanos quanto em modelos experimentais, estudos demonstraram uma forte ativação do sistema imune inato com envolvimento de macrófagos e células natural killer (NK), acompanhada ainda por expansão da população de linfócitos B, especialmente da subpopulação

CD5⁺ (ORTIZ *et al.*, 1976, HATCHER *et al.*, 1981, SATHLER-AVELAR *et al.*, 2003; VITELLI *et al.*, 2004). Estudo fenotípico realizado durante a infecção recente pelo *T. cruzi*, após classificação com base sorológica, descreveu, no grupo de indivíduos portadores da fase aguda recente, supressão da atividade de linfócitos T, ativação de linfócitos B e favorecimento da migração de monócitos para o foco inflamatório, avaliada através da expressão da molécula de adesão CD54. Já na fase aguda mais tardia foi observada ativação de células NK independente de células T, e na fase crônica recente, aumento da população de linfócitos B totais ao lado de um aumento da população dos monócitos pró-inflamatórios - CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺ (SATHLER-AVELAR *et al.*;2003).

Sabe-se que os macrófagos desempenham papel essencial no controle da infecção, secretando uma variedade de mediadores químicos, incluindo citocinas, que regulam diferentes compartimentos do sistema imunológico. Eles adquirem, processam e apresentam antígenos para células T, e são fonte de moléculas co-estimuladoras para ativação destas células. Uma vez estimulados por antígenos derivados de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, podem atuar como células efetoras com atividade citotóxica, no caso parasiticida, com produção de metabólitos reativos de nitrogênio, oxigênio e citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12 (CAMARGO *et al.*, 1997; CHANDRASEKAR *et al.*, 1998, ROCHA *et al.*, 2003).

O neutrófilo também apresenta papel essencial na patogênese de doenças inflamatórias, infecciosas ou não. Está entre as células que primeiro alcançam o foco inflamatório, eles atuam como fagócitos efetores na resposta imune inata e adaptativa. Entretanto, apresenta meia-vida curta, sofrendo apoptose e sendo removido por macrófagos. Desempenham funções efetoras e moduladoras cruciais como fagocitose, secreção de proteases, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, que além de conferir proteção às infecções, podem conduzir à destruição tecidual (WATSON *et al.*, 1997). Entretanto, o papel de neutrófilos na defesa contra infecções intracelulares foi negligenciado por longo tempo, pois acreditava-se que patógenos intracelulares, mantidos no interior de macrófagos, estavam protegidos da ação fagocítica de neutrófilos. Ultimamente, demonstrou-se que neutrófilos e macrófagos são colaboradores importantes no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2006). Na infecção pelo *T. cruzi*, estudos anteriores demonstraram atividade lítica eficiente de formas tripomastigostas

sanguíneas por neutrófilos de camundongos através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos - ADCC (KIPNIS *et al.*, 1981) e atividade de fagocitose *in vitro* de formas epimastigotas por neutrófilos de pacientes não infectados na presença de anticorpos anti-*T. cruzi* (RIMOLDI *et al.*, 1981).

As células NK possuem um papel indispensável na resposta imune anti-*T. cruzi*. Atuam como importante fonte de produção de IFN- γ na ausência de células T específicas. São as primeiras células a produzirem esta citocina antes do desenvolvimento da resposta imune mediada por células T, favorecendo precocemente uma resposta do tipo 1, sabidamente protetora na fase inicial na doença de Chagas, por controlar a multiplicação parasitária (TORRICO *et al.*, 1991, SILVA *et al.*, 1992;). Estudos desenvolvidos por Vitelli e colaboradores, em 2004, demonstraram que, em pacientes com a forma crônica indeterminada, havia aumento de células NK totais à custa de maior frequência de células NK maduras (CD3⁻CD56^{DIM}CD16⁺), com maior potencial citolítico, sugerindo que a maior atividade da célula NK possa representar um evento protetor na infecção. A atividade citotóxica elevada mediada por anticorpos (ADCC) poderia ser o fundamento desse mecanismo protetor. Inclusive, já foi descrito que células NK apresentam atividade tripanomicida com destruição extracelular de formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*. (PAPAZAHARIADOU *et al.*, 2007).

Considerando a imunidade humoral, anticorpos anti-*T. cruzi* são amplamente detectados em portadores da doença de Chagas (BRENER, 1980). KRETTLI & BRENER (1982) revolucionaram os estudos da imunidade humoral na doença de Chagas quando demonstraram a existência de duas categorias de anticorpos funcionalmente distintas no soro de hospedeiros infectados pelo *T. cruzi*, os quais foram denominados anticorpos da sorologia convencional (ASC) e anticorpos líticos (AL). Os ASC, também denominados não protetores, são encontrados no soro de hospedeiros infectados pelo *T. cruzi* mesmo após quimioterapia eficaz. Esses anticorpos são identificados *in vitro* por técnicas sorológicas de rotina. Por outro lado, anticorpos da categoria AL, também conhecidos como anticorpos protetores, são encontrados apenas no soro de hospedeiros com infecção ativa, desaparecendo após a cura por intervenção terapêutica específica para a doença de Chagas. Esses anticorpos são específicos para epitopos presentes na superfície de formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi*, sendo identificados *in vitro* através das técnicas de

lise mediada pelo complemento (GALVÃO *et al.*, 1993) e, mais recentemente, pela citometria de fluxo (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995). Por serem capazes de induzir a lise mediada pelo complemento de formas tripomastigotas sanguíneas, os anticorpos da categoria AL têm sido considerados importantes no controle da parasitemia na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, e assim, a sua presença, indireta ou diretamente, poderia estar associada ao estabelecimento da forma crônica indeterminada. Corroborando esta hipótese, estudos anteriores demonstraram a presença de altos títulos de IgG1 de anticorpos líticos em pacientes da forma indeterminada quando comparados com indivíduos portadores da forma clínica cardíaca (CORDEIRO *et al.*, 2001). Estes achados enfatizam o papel protetor das imunoglobulinas anti-formas tripomastigotas vivas.

Receptores para a fração cristalizável (Fc) (Fc γ Rs) das imunoglobulinas G são considerados como componentes importantes na interação entre a resposta imune celular e humoral (RAVETCH *et al.*, 1986). As imunoglobulinas de classe G (IgG) exercem inúmeras funções biológicas importantes por interagirem com vários tipos celulares. A base desta interação é a ligação dos domínios Fc da IgG com receptores específicos presentes nas membranas de células do sistema imune (DAERON, 1997). A detecção destes receptores presentes na população celular do sangue periférico pode ser de grande importância para entendermos os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento de resistência ou patologia na doença de Chagas. A distribuição seletiva destes receptores e sua diversidade nos permitem desenvolver hipóteses sobre o envolvimento dessas moléculas na resposta imune desencadeada pelo *T. cruzi*. Como o aumento de anticorpos no grupo indeterminado juntamente com o aumento da expressão dos receptores teria alguma relação com a morbidade na infecção crônica? Uma vez que as funções biológicas dependem do tipo do receptor e do tipo celular no quais esses são expressos, será que na resposta imune inata o aumento da expressão desses receptores apresentaria correlação com o desenvolvimento de formas mais graves da doença? E após estimulação antígeno específica qual seria a relação dos receptores e as formas crônicas da doença? Os Fc γ Rs podem interagir com moléculas de IgG em duas condições: na forma de IgG monomérica ou quando essa se encontra complexada a antígenos multivalentes, na forma de imunocomplexos. Tal interação resulta na estimulação de respostas biológicas específicas de cada tipo celular (DAERON, 1997). Estas funções vão

desde atividades efetoras como a fagocitose, controle na secreção de citocinas, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e degranulação de células, liberação de enzimas lisossomais, *clearance* de imunocomplexos (IC), até sinais imunomoduladores como a regulação da proliferação e secreção de anticorpos por linfócitos B (RAVETCH & KINET, 1991, FLORES-BORJA *et al.*, 1998, PLEASS & WOOF, 2001).

Em humanos existem três categorias de FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16). Quanto à sua estrutura molecular, os FcγRs podem apresentar dois ou três domínios extracelulares semelhantes aos das imunoglobulinas (*Ig-like*), que são altamente conservados entre as diferentes classes de receptores. Além disso apresentam domínio transmembrânico e domínios citoplasmáticos, sendo estes variáveis entre as classes de FcγR (FLORES-BORJA *et al.*, 1998, PLEASS & WOOF, 2001; MARZOCCHI-MACHADO & LUCISANO-VALIM, 2005).

O CD64 (FcγRI) é encontrado em macrófagos, monócitos e neutrófilos ativado e apresenta alta afinidade para IgG1 e IgG3, embora existam três genes que codificam o FcγRI, somente o gene A codifica o receptor de alta afinidade FcγRIa. A isoforma FcγRIb é de baixa afinidade e somente detectada *in vitro*. Quando a molécula de IgG liga-se ao domínio extra-celular da subunidade do receptor FcγRIa, ocorre ativação em seu domínio citoplasmático, de uma seqüência estrutural denominada de seqüência ou motivo de ativação de imuno-receptor baseada em tirosina (ITAM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Os ITAMs possuem resíduos de tirosina que são fosforilados por tirosina quinases, dando início a uma cascata de eventos bioquímicos no citoplasma, que culminam na ativação de resposta biológica da célula específica. Desta forma são os ITAMS que transmitem para o interior da célula o sinal da ligação da ligação da IgG ao seu receptor (GESSNER *et al.*, 1998), induzindo fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), remoção de imunocomplexos, aumento da apresentação de antígenos e ativação de macrófagos (PLEASS & WOOF, 2001; MARZOCCHI-MACHADO & LUCISANO-VALIM, 2005).

O CD32 (FcγRII) é encontrado em macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos B e eosinófilos sendo receptor de média afinidade para IgG1 e IgG3 agregadas. Compreende duas subclasses de receptor, FcγRIIa e FcγRIIb e as diferenças funcionais entre as subclasses estão na presença de seqüências de

sinalização especializadas. O FcγRIIa apresenta uma sequência ITAM, enquanto em FcγRIIb é encontrado o motivo de inibição de imuno-receptor baseado em tirosina (ITIM: *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*). Esses resíduos de tirosina em ambos os motivos de sinalização intracelular (ITAM e ITIM) são determinantes para ativação e a inibição celular, respectivamente (VAN DEN HERIK-OUDIJK *et al.*, 1995). Este receptor apresenta função na fagocitose, ADCC e bloqueia sinais de ativação iniciados pelo receptor antigênico de linfócito B, atuando como um regulador negativo da resposta imune humoral (PLEASS & WOOF, 2001; MARZOCCHI-MACHADO & LUCISANO-VALIM, 2005).

O CD16 (FcγRIII) é encontrado em macrófagos, monócitos, células NK e neutrófilos, sendo receptor de baixa afinidade, apresentando as isoformas FcγRIIIa e FcγRIIIb. A união de receptores FcγRIIIa induzida pela ocupação por IgG1 e IgG3 associado ao antígeno na superfície da célula, ativa células NK a lisarem o alvo através de ADCC. Ocorre também a síntese e secreção de citocinas, como IFN-γ pela célula NK. Já em neutrófilos o FcγRIIIb é um glicofosfatidilinositol (GPI) e sua forma solúvel parece ter um papel importante na prevenção de infecções. Embora este receptor não possua seqüência de sinalização no citoplasma, a sua interação com os outros receptores na superfície celular é importante para uma resposta efetora mais completa, visto que a cooperação do FcγRIIIb com FcγRIIIa é necessária para fagocitose, ADCC e degranulação eficientes. Além disso, a co-agregação dos FcγRIIIb nos neutrófilos leva à ativação celular (ZHOU & BROWN, 1994, MARZOCCHI-MACHADO & LUCISANO-VALIM, 2005).

Existem quatro estudos sobre os FcγRs na doença de chagas e todos foram realizados em modelos experimentais. Em 1998, Coutinho demonstrou um aumento da expressão de FcγRII/III associados ao aumento da expressão de receptores para alpha-2-macroglobulina em macrófagos residuais em camundongos. Araújo-Jorge e colaboradores em 1993 demonstraram o aumento da produção de anticorpos e da expressão dos Fcγ RII e Fcγ RIII em células do baço e linfonodos de camundongos, antes e depois da detecção de anticorpos específicos para o *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção. O mesmo grupo em outro trabalho de 1993 demonstrou que um aumento de anticorpos reduz a mortalidade e parasitemia em camundongos infectados e diminui a disponibilidade dos FcγR na membrana celular. E Plata e

colaboradores em 1984 demonstrou um aumento na produção por linfócitos B e T de anticorpos anti-formas tripomastigostas do *T. cruzi* e IFN-gamma, respectivamente, poderiam contribuir in vivo com um papel protetor.

Estudo recente realizado em nosso laboratório avaliou no contexto *ex-vivo* receptores Fcγ em diferentes populações do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e demonstrou que pacientes da forma clínica crônica indeterminada apresentam expressão maior de CD64 em monócitos, bem como maior frequência de monócitos CD16⁺ que pacientes da forma clínica cardíaca (Vitelli D. M., 2004). Estes dados associados com os elevados níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* observados por Cordeiro *et al.* (2001), poderiam estar relacionados à modulação de monócito, sugerindo um envolvimento dessas células em mecanismos imunomoduladores de pacientes assintomáticos, através da interação com imunocomplexos. Este estudo demonstrou, ainda, maior expressão de CD32 em linfócitos B em pacientes cardíacos, o que pode ser considerado um elemento complementar da dinâmica da produção de anticorpos por indivíduos deste grupo, já que o receptor CD32 está relacionado com a regulação negativa da produção de imunoglobulinas em linfócitos B (FIG 1). Essas informações em conjunto são consistentes com o menor nível de anticorpos observados por Cordeiro *et al.* (2001) e Vitelli D. M. (2004) no plasma de pacientes cardiopatas em relação aos assintomáticos.

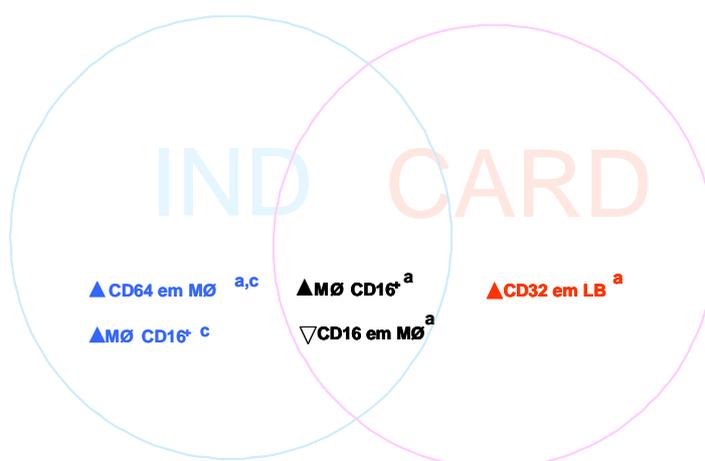


FIGURA 1 - Interseção do perfil de expressão de receptores Fcγ entre pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da fase crônica da doença de Chagas. A orientação das setas representa elevação ou diminuição de um dos receptores em relação aos grupos NI e CARD, indicados pelas letras "a" e "c", respectivamente (Vitelli D. M., 2004).

Baseados nestas informações propusemo-nos aprofundar o estudo sobre o papel dos Fc γ R na imunopatogenia da doença de Chagas através da avaliação do impacto da estimulação por antígenos derivados de formas tripomastigotas do *T. cruzi* sobre a expressão de Fc γ R em leucócitos circulantes de pacientes portadores da infecção crônica pelo *T. cruzi* buscando associá-lo ao perfil de imunoglobulinas séricas anti-*T. cruzi*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Esse estudo tem como foco principal de abordagem, *avaliar o impacto da estimulação por antígenos derivados de formas tripomastigotas do T. cruzi sobre a expressão de Fc γ Rs por leucócitos circulantes de pacientes portadores da infecção crônica pelo T. cruzi.*

Para alcançar o objetivo proposto, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar os títulos de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi* em pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas;
2. Avaliar a expressão de receptores Fc γ (CD64, CD32 e CD16) em neutrófilos, monócitos, linfócitos B e linfócitos totais no contexto *ex-vivo* e em cultura estimulada com antígenos solúveis de *T. cruzi*;
3. Associar paralelamente o impacto do estímulo antigênico na expressão de Fc γ Rs em leucócitos circulantes com o perfil de imunoglobulinas séricas anti-*T. cruzi*;

PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

I – PACIENTES

Para a realização deste estudo, foram selecionados 29 indivíduos, voluntários, sendo 18 pacientes adultos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e 11 indivíduos não infectados, provenientes da cidade de Bambuí/MG. Todos os participantes foram submetidos a testes de sorologia convencional específicos para o diagnóstico da doença de Chagas. Os indivíduos pertencentes aos grupos de pacientes chagásicos apresentaram resultados concomitantemente positivos nas reações de hemaglutinação indireta (HAI) e imunofluorescência indireta (IFI) para o *T. cruzi* e encontravam-se na fase crônica da infecção. Os pacientes foram submetidos a exames complementares que permitiram agrupá-los, segundo classificação baseada em aspectos clínicos, radiológicos e eletrocardiográficos, como pacientes portadores da forma clínica indeterminada (IND) e cardíaca (CARD), segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002). Indivíduos do grupo IND foram selecionados a partir da comprovação da infecção chagásica na ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas ou radiológicas de acometimento cardíaco ou digestivo. Os portadores da forma clínica CARD foram caracterizados pela presença de sintomas, sinais físicos e alterações em exames laboratoriais (eletrocardiograma /ECG e radiografia de tórax). O grupo controle utilizado como parâmetro comparativo para as análises consistiu de adultos saudáveis, residentes na cidade de Bambuí/MG, apresentando resultados negativos para os testes de sorologia convencional, utilizados para o diagnóstico laboratorial da doença de Chagas.

A conduta clínico-laboratorial adotada nesse estudo foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ. Todos os procedimentos, incluindo os estudos eletrocardiográficos, radiológicos e a assistência médico-laboratorial dada aos pacientes, bem como o acompanhamento ambulatorial e a coleta de sangue esteve sob a responsabilidade do Dr. João Carlos Pinto Dias e do Dr. João Soares Moreira Magalhães do Posto Avançado de Pesquisas Emanuel Dias/Bambuí-MG e contaram com a colaboração do Prof. Aluizio Prata da Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Uberaba/MG.

A participação dos voluntários neste estudo consistiu na doação de 25mL de sangue coletados através do sistema de coleta à vácuo (Vacuntainer, BD) em três frascos separados, sendo um frasco de 5mL contendo EDTA como anti-coagulante e

dois frascos de 10mL cada, contendo heparina como anti-coagulante. O sangue coletado em EDTA foi utilizado para o estudo do perfil imunofenotípico de leucócitos periféricos e o material coletado em heparina foi empregado para separação de plasma utilizado nos estudos de reatividade de anticorpos anti-*T. cruzi* e realização do protocolo de cultura de curta duração *in vitro*.

A tabela. I sumariza as informações concernentes aos grupos de pacientes estudados.

TABELA I

População estudada

Grupos	Nº de Indivíduos	Sigla	Idade	Sexo M/F
Não Infectados	11	NI	20-53	3/8
Chagásicos				
Indeterminados	7	IND	44-67	3/4
Cardíacos	11	CARD	50-70	4/7

II – MATERIAL E MÉTODOS

1 – Análise do perfil de imunoglobulinas séricas anti-*T. cruzi*

1.1 – Obtenção de formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células LLCMK2 infectadas pelo *T. cruzi*. As células foram semeadas em frascos de cultura de tecido de 25cm² (Falcon) contendo meio DMEM-5% SBF. Após a adesão e formação da monocamada de células, estas foram infectadas com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa CL do *T. cruzi* na proporção de 10 parasitos/célula. As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂, 95% de umidade por 24h para favorecer a infecção. Após esse período, as células foram lavadas para retirar os parasitos remanescentes e mantidas com meio DMEM-5% SBF a 33°C, 5% de CO₂, 95% de umidade (BERTELLI *et al.*, 1977). O meio foi

trocado diariamente, e a partir do sexto dia de cultura formas tripomastigotas puderam ser coletadas no sobrenadante. Os parasitos foram separados dos restos celulares, por centrifugação diferencial. Inicialmente, a suspensão de parasitos foi centrifugada em tubos cônicos de 50 mL à temperatura ambiente, 100 x g por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para que as formas flageladas pudessem se deslocar do sedimento para o sobrenadante. Esse foi coletado e centrifugado a 4°C, 1.000 x g por 10 minutos. Os parasitos foram lavados 3 vezes em PBS (0,015M pH 7,4) nas condições anteriores e empregados nos ensaios de detecção de IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas.

1.2 – Ensaio de detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*

A concentração da suspensão dos parasitos foi ajustada para $5,0 \times 10^6$ /mL em PBS-10% SBF para o ensaio de imunofluorescência indireta.

Os ensaios de citometria de fluxo para o estudo de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi* presente em plasmas de pacientes portadores da doença de Chagas foram realizados segundo protocolo descrito por MARTINS-FILHO *et al.* (1995), e adaptado para microplacas. Em placas de 96 poços com fundo em “U” (Nunc, Denmark) foram adicionados 50µL do plasma feita diluição seriada de (1:124 -1:16.384) em PBS-10% SBF e 50µL da suspensão de parasitos ($2,5 \times 10^5$ parasitos/poço). A mistura foi incubada a 37°C por 30min, lavada 2 vezes com 150µL de PBS-10% SBF, centrifugada (4°C, 1.000 x g, por 10min) e o sobrenadante desprezado.

Para a detecção de IgG1 anti-formas tripomastigotas do *T. cruzi* os parasitos foram submetidos a 2 etapas de incubação. Na primeira etapa, 50µL de anticorpos anti-IgG1 biotinizados (Sigma) diluídos em PBS-10% SBF foram adicionados a cada poço da placa e a mistura incubada a 37°C por 30 min. Após a incubação, os parasitos foram lavados e centrifugados 2 vezes como descrito acima e o sobrenadante desprezado. Na etapa seguinte, os parasitos foram reincubados (37°C, 30 min, ao abrigo da luz) com 10 µL de estreptavidina conjugada com ficoeritrina-SAPE (Gibco) diluída 1:400 em PBS-10% de SBF. Após a incubação os parasitos foram novamente lavados, centrifugados e o sobrenadante desprezado.

Para cada ensaio foi feito um controle da reação, onde os parasitos foram incubados na ausência de plasma humano, porém na presença do anticorpo

secundário. Em todos os testes foram incluídas amostras controles de plasmas positivo e negativo para a doença de Chagas.

Após as etapas de incubação com os reagentes marcados com fluorocromos, os parasitos foram fixados com 200 μ L de solução fixadora -Macs Facs Fix- MFF (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). As amostras foram mantidas a 4°C, por pelo menos 30min, ao abrigo de luz, para realização da leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson). O tempo máximo para a coleta dos dados foi sempre inferior à 24h. Os dados coletados foram armazenados permitindo a análise posterior. Os resultados foram analisados empregando a estratégia de análise do percentual de parasitos fluorescentes positivos – PFP.

1.3 – Análise o percentual de parasitos fluorescentes positivos – PFP

A análise da reatividade de anticorpos anti-*T. cruzi* foi realizada segundo proposto por MARTINS-FILHO *et al.* (1995) e modificado por CORDEIRO *et al.* (2001). A figura 2 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise da reatividade de IgG anti-formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi*. Inicialmente, a população de interesse – R1 foi selecionada, em gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC), com base em aspectos morfométricos dos parasitos (FIG.2A). Formas tripomastigotas do *T. cruzi* apresentam uma distribuição característica e homogênea em gráficos de FSC *versus* SSC, o que permite o posicionamento da região R1. Em seguida, histogramas individuais de intensidade de fluorescência em função do número de parasitos, foram utilizados para determinar o percentual de parasitos fluorescentes positivos (PFP) para cada diluição das amostras utilizadas. Para tal, inicialmente foi determinado um limiar de ligação inespecífica do conjugado anti-IgG1 humano revelado com PE, utilizando-se de histogramas de fluorescência obtidos a partir do tubo controle do conjugado, realizado para cada experimento (FIG.2B). O posicionamento do marcador do limiar seguiu sempre o critério de se obter no máximo 2% de PFP para o controle interno da reação. Em seguida, empregando-se o mesmo marcador foram obtidos os valores de PFP para cada diluição das amostras testadas (FIG.2C e D). Para cada experimento eram realizados ensaios empregando amostras controle positivo e controle negativo. Para a interpretação dos resultados, foi estabelecido um ponto de

corde equivalente ao PFP de 50% como limiar entre alta (PFP>50%) e baixa reatividade (PFP ≤50%).

Essa modalidade de análise foi empregada para a obtenção dos dados referentes ao objetivo específico I.

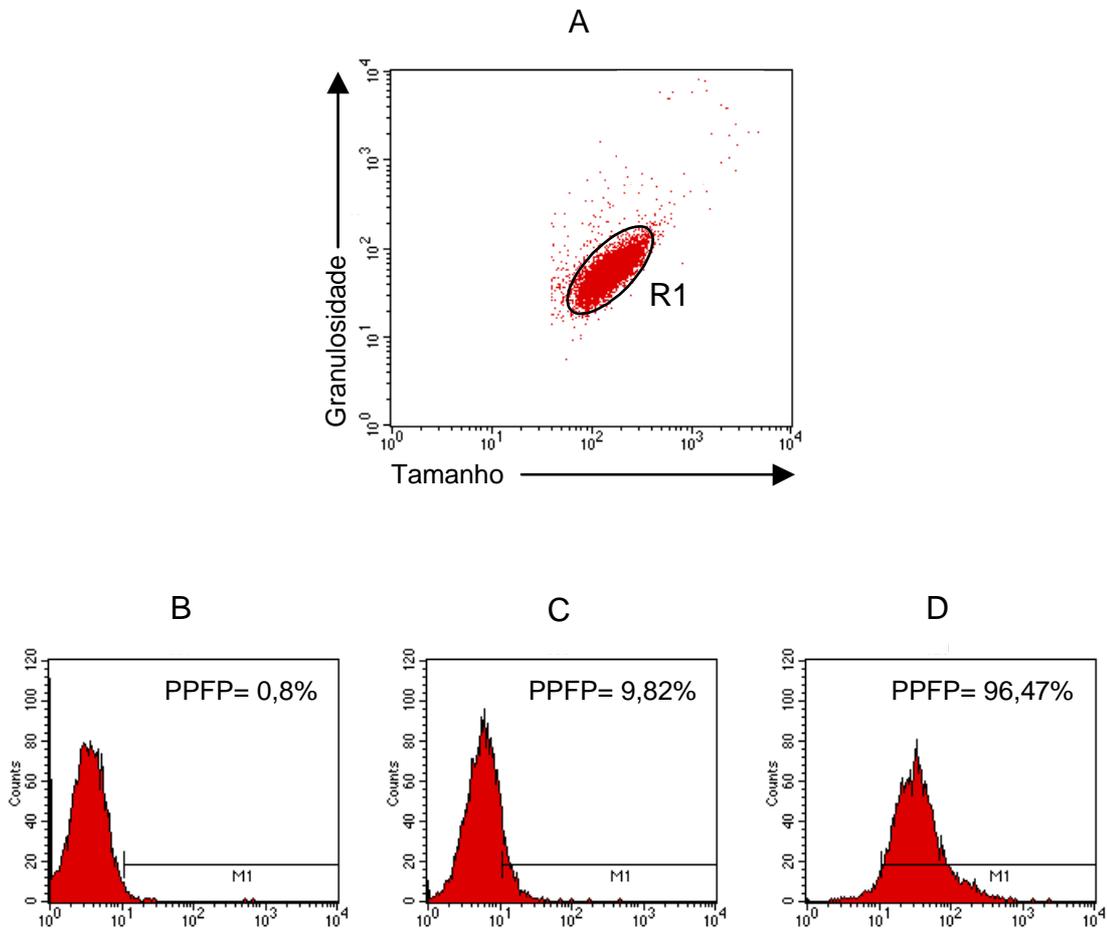


FIGURA 2 – Seqüência de passos utilizados para as análises da reatividade de IgG anti-tripomastigotas do *T. cruzi* por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para seleção da população de interesse, nesse caso formas tripomastigotas do *T. cruzi* – R1. (B) Histograma individual utilizado para posicionar o limiar de ligação inespecífica equivalente a um valor de PFP ≤2%, utilizando o controle interno da reação. (C) Histograma individual representativo do valor de PFP obtido após a incubação com uma amostra controle negativo (D) Histograma individual representativo do valor de PFP obtido após a incubação com uma amostra controle positivo.

2 – Análise do padrão de expressão de FcγR

2.1- Contexto *Ex-vivo*

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram realizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante, modificado conforme descrito a seguir:

Em tubos de poliestireno 22x75mm foram adicionados 5μL do anticorpo monoclonal específico marcado com fluorocromo para o marcador de superfície celular de interesse (TAB.II). Para cada análise foram utilizados 50μL de sangue periférico total coletado a vácuo em tubos de 5mL contendo EDTA como anticoagulante. Após etapa de homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution - Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. Após homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (400 x g, 10 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 2mL de PBS (0,015M pH 7,4), empregando as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Em seguida, as amostras foram fixadas com 300μL de solução fixadora – MFF. Após um período de 15 minutos a 4°C, a análise dos parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo foi determinada com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScalibur - Becton Dickinson), utilizando o programa CELLQuest™ foi utilizado para aquisição e análise dos dados, empregando diferentes estratégias de análises.

TABELA II

Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações celulares e moléculas de superfície.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Células Alvo	Receptores
Anti-IgG1	FITC, PE	G1CL	-	-
Anti-CD14	TC	TüK4	Monócitos	-
Anti-CD16	FITC, TC	3G8	Células NK, Monócitos e Neutrófilos	FcγRIa e FcγRIb
Anti-CD19	FITC, TC	4G7, SJ25-C1	Linfócitos B	-
Anti-CD32	FITC	FLI8.26	Monócitos, Neutrófilos e Linfócitos B	FcγRIIa, FcγRIIb e FcγRIIc
Anti-CD64	FITC	10.1	Monócitos	FcγRIIIa

2.2 – Frente à estimulação antígeno-específica

2.2.1 – Preparação de antígeno solúvel

Formas tripomastigotas, obtidas conforme descrito no item 1.1 de material e métodos, da cepa CL do *T. cruzi* previamente estocadas a -70°C foram transferidas para o cone de vidro do aparelho Virtex e submetidas a 10 ciclos de 30 rpm feitos manualmente. Em seguida este extrato foi transferido para um tubo Falcon de 50mL e levado ao nitrogênio líquido por 1 minuto e banho-maria a 37°C por 10 minutos. Este procedimento foi realizado 3 vezes. Quando uma alíquota do extrato antigênico foi observada em microscópio óptico, a fim de verificar o total rompimento dos parasitos e a formação de massa antigênica uniforme. Posteriormente, a massa antigênica obtida foi centrifugada a 37.000 x g, 4°C por 70 minutos. O sobrenadante obtido foi dialisado e filtrado em membrana 0,22µm. Uma alíquota foi empregada para a dosagem de proteínas segundo o método de Lowry (1951), necessária para a definição do volume que seria utilizado para estimular as culturas de células. Esta etapa foi sob supervisão da pesquisadora Andréa Texeira do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

2.2.2 – Imunofenotipagem de leucócitos do sangue periférico após estimulação antígeno específica

Alíquotas de 500 μ L de sangue periférico, coletados a vácuo em tubos de 10mL contendo heparina sódica, foram adicionadas a 2 tubos de polipropileno de 14mL. Ao tubo 1 foi adicionado 100 μ L do antígeno solúvel (2mg/mL) proveniente de formas tripomastigotas do *T. cruzi* mais 400 μ L meio de cultura. Este tubo foi incubado por 1 hora em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. Ao tubo controle, 2, foi adicionado apenas 500 μ L de meio de cultura e em seguida foram adicionados 10 μ L de Brefeldina A 1mg/mL (concentração final de 10 μ g/mL) e as amostras foram incubadas por 4 horas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Em tubos de poliestireno 22x75mm foram adicionados 5 μ L de cada anticorpo monoclonal específico utilizado para identificar as células e os receptores para imunoglobulina de interesse (TAB.II). Para cada análise foram utilizados 100 μ L da amostra proveniente da cultura estimulada ou da cultura controle. Após homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise comercial diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vortex, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (400g, 10 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas com 2mL de PBS, empregando as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Em seguida, as amostras foram fixadas com 300 μ L de solução fixadora – MFF. As amostras foram mantidas a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo (FACSCalibur-Becton Dickinson), utilizando o programa CELLQuest™. O tempo máximo para aquisição dos dados foi inferior à 24hs após a realização dos ensaios.

2.3 – Estratégias de análise da Intensidade Média de Fluorescência

Os dados obtidos foram analisados utilizando a estratégia de análise semiquantitativa empregando recursos do programa CELLQuest™.

2.3.1 – Análise da IMF de FcγR em neutrófilos

A análise da expressão de FcγR (CD32, CD16) na população de neutrófilos foi feita através da análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência. A FIG.3 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise da expressão de CD32 e CD16 em neutrófilos. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (FIG.3A), foram construídos histogramas de FL1/CD32 e FL1/CD16 para a identificação da intensidade média de fluorescência para cada FcγR analisado na população de neutrófilos (FIG.3B).

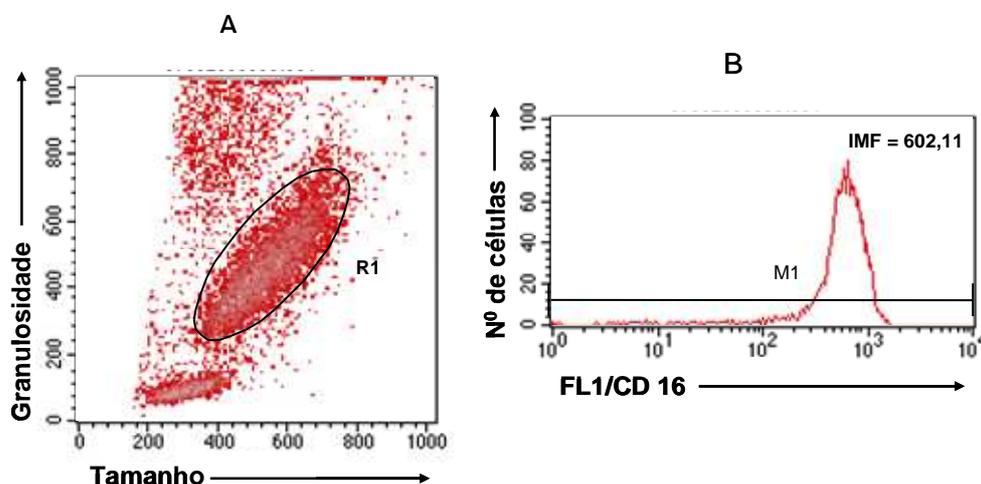


FIGURA 3 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão de receptores FcγR (CD32 e CD16) na população de neutrófilos. (A) Gráfico de distribuição puntual tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) utilizado para seleção da população de interesse, nesse caso neutrófilos-R1. (B) Histograma utilizado para quantificar a expressão de FcγR em neutrófilos, através da intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal obtida pelo posicionamento do marcador M1.

2.3.2 – Análise da IMF de FcγR em monócitos

A análise da expressão de FcγR (CD64, CD32, CD16) na população de monócitos foi feita através da análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência. A FIG.4 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise da expressão de FcγR em monócitos. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, através de gráficos de distribuição puntual de FL3/CD14 *versus* granulosidade (SSC) (FIG.4A), foram construídos histogramas de FL1/CD64, FL1/CD32 e FL1/CD16 para a identificação da intensidade média de fluorescência para cada FcγR analisado na população de

monócitos (FIG.4B).

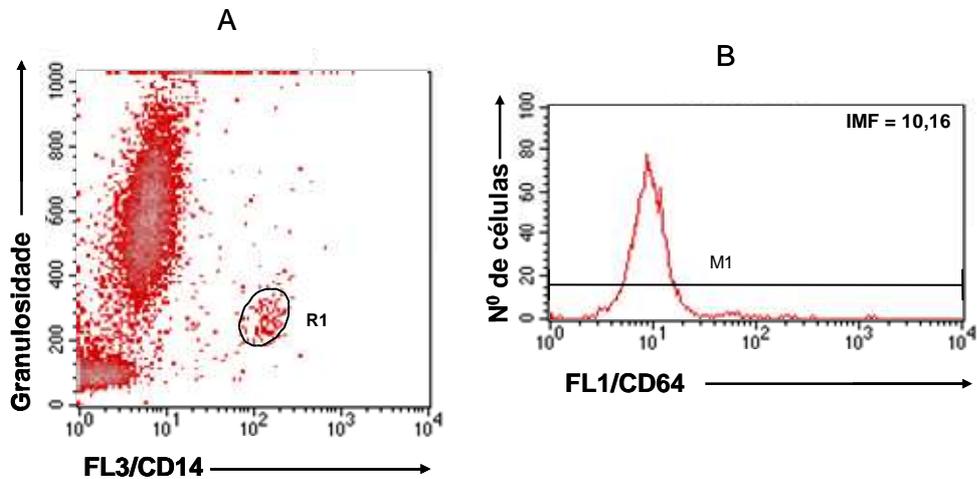


FIGURA 4 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão de receptores FcγR (CD64, CD32 e CD16) na população de monócitos. (A) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD14 versus granulosidade (SSC) utilizado para seleção da população de interesse, neste caso, células CD14+ de granulosidade intermediária, corresponde aos monócitos-R1. (B) Histograma utilizado para quantificar a expressão de FcγR em monócitos, através de alterações na intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal obtida pelo posicionamento do marcador M1.

2.3.3 – Análise da IMF de FcγR em linfócitos totais

A análise da expressão de FcγRIII (CD16) na população de linfócitos totais foi feita através da análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência. A FIG.5 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise da expressão de CD16 em linfócitos totais. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (FIG.5A), foram construídos gráficos de tamanho (FSC) versus FL1/CD16 para a identificação da intensidade média de fluorescência para o FcγRIII na população de linfócitos (FIG. 5B).

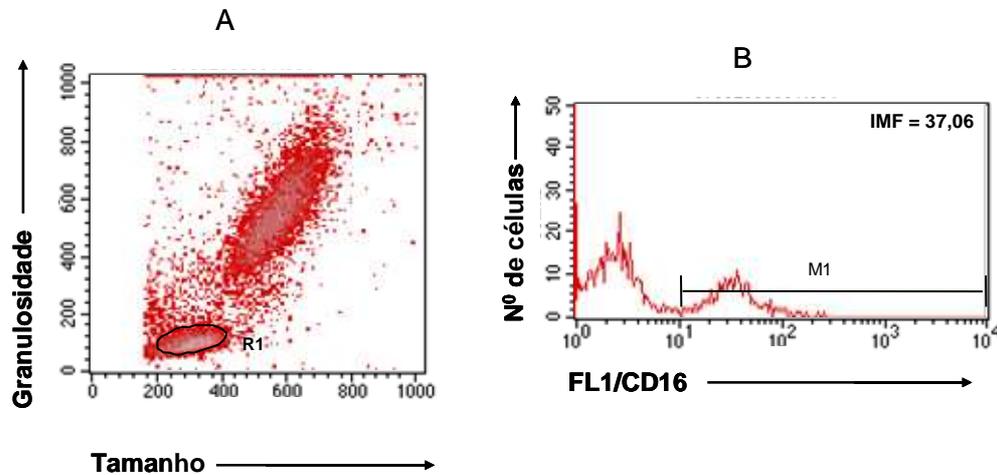


FIGURA 5 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão do receptor $Fc\gamma$ RIII (CD16) na população de linfócitos totais. (A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) utilizado para seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos totais - R1. (B) Histograma utilizado para quantificar a expressão de $Fc\gamma$ R em linfócitos totais, através de alterações na intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal obtida pelo posicionamento do marcador M1.

2.3.4 – Análise da IMF de $Fc\gamma$ R em linfócitos B

A análise da expressão de $Fc\gamma$ RII (CD32) na população de linfócitos B foi feita através da análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência. A FIG.6 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise da expressão de CD32 em linfócitos B. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, através de gráficos de distribuição puntual de FL3/CD19 *versus* granulosidade (SSC) (FIG.6A), foram construídos histogramas de FL1/CD32 para a identificação da intensidade média de fluorescência para o $Fc\gamma$ RII analisado na população de linfócitos B (FIG.6B).

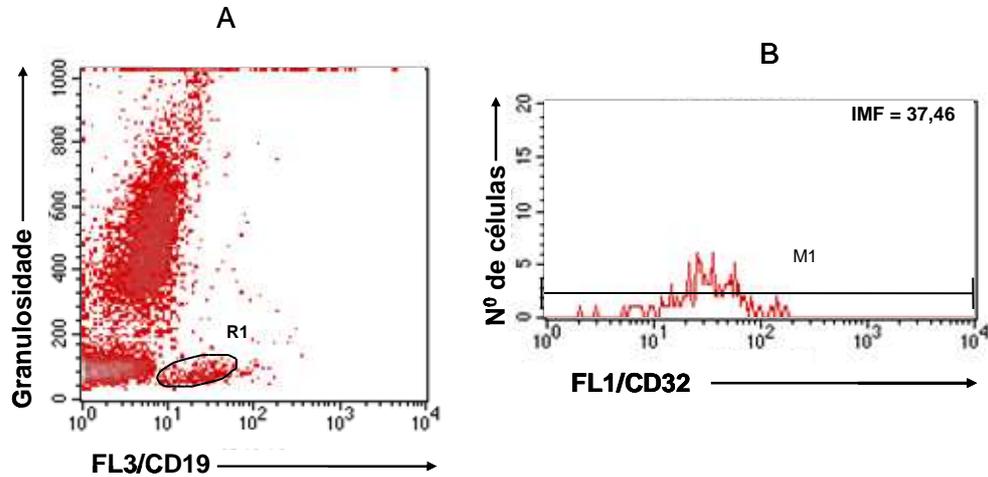


FIGURA 6 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão do receptor $Fc\gamma$ RII (CD32) na população de linfócitos B. (A) Gráfico de distribuição puntual de FL3/CD19 *versus* granulosidade (SSC) utilizado para seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos B -R1. (B) Histograma utilizado para quantificar a expressão de $Fc\gamma$ RII em linfócitos B, através de alterações na intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal.

2.3.5 – Cálculo da Capacidade Total de Fluorescência

Com o objetivo de avaliar a magnitude da expressão dos receptores $Fc\gamma$, levando em consideração que existem variações no percentual das diferentes populações leucocitárias do sangue periférico, propusemos avaliar a Capacidade Total de Fluorescência (CTF), que é o termo usado para descrever a capacidade total de fluorescência de uma população de células e resulta da multiplicação da IMF de um receptor expresso em uma população pelo percentual desta população celular do hemograma (valor relativo). Esta fórmula foi empregada para a cultura controle e para cultura estimulada para o cálculo do impacto da estimulação antígeno-específica.

TABELA III

Modelo para o cálculo da Capacidade Total de Fluorescência (CTF).

Exemplo do cálculo da CTF

Número Relativo	IMF de CD16 em monócitos x % de monócitos do Hemograma
	97,99 x 4 = 391,96

2.3.6 – Cálculo da razão Cultura estimulada/Cultura controle

A análise do impacto da estimulação antígeno específica foi feita a partir do cálculo da razão entre os resultados de CTF obtidos na cultura estimulada pelos valores obtidos na cultura controle.

3- Análise estatística

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos à análise de normalidade de distribuição dos valores. Nas amostras com distribuição normal, ou seja, paramétricas, foi aplicado o teste de Turkey, empregando o programa Prism 4.0. Já para as amostras com distribuição não normal, ou seja, não paramétricas foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunn. Análises de correlação entre variáveis de distribuição paramétrica ou não paramétrica foram realizaddas pelos testes de Pearson ou Spearman, respectivamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$. Todo o procedimento de análise estatística dos dados foi realizado sob a supervisão e orientação da Bioestatística Ana Carolina, consultora de estatística do CPqRR/FIOCRUZ.

RESULTADOS

Estudo da reatividade de IgG1 anti-formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* no soro de pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas, através da pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo

Reatividade de anticorpos da classe IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas (FC-ALTA) do *Trypanosoma cruzi* em soros individuais de pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas

Para avaliar a reatividade de IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas (FC-ALTA) de *T. cruzi* no soro, foram realizados ensaios de pesquisas de anticorpos por citometria de fluxo através da análise do percentual de parasitos fluorescentes positivos (PPFP), segundo proposto por MARTINS-FILHO et al. (1995) e modificado por CORDEIRO et al. (2001), como descrito em Materiais e Métodos.

A curva de reatividade de IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi* foi traçada empregando diluições seriadas (1:128 a 1:16.384) dos soros de pacientes chagásicos para cada grupo avaliado (NI, IND e CARD). Os resultados da reatividade dos soros, expressos como PPFP, estão mostrados na FIG.7. Para interpretação dos resultados foi estabelecido um ponto de corte de PPFP igual a 50% para determinação de alta (PPFP>50%) e baixa (PPFP≤50%) reatividade dos soros, como proposto por Vitelli-Avelar et al. (2006). A análise dos dados demonstrou que na diluição de 1:4096 havia uma reatividade diferencial entre os pacientes chagásicos, permitindo evidenciar dois grupos: pacientes com alta reatividade e pacientes com baixa reatividade. Análises subseqüentes, utilizando apenas os resultados do soro na diluição de 1:4096, demonstraram que 80% dos pacientes IND e 64% dos pacientes do grupo CARD apresentaram alta reatividade ($p<0,05$) (FIG.8).

Esses resultados nos permitem afirmar que também na população agora em estudo, os níveis de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi* são mais elevados nos pacientes assintomáticos.

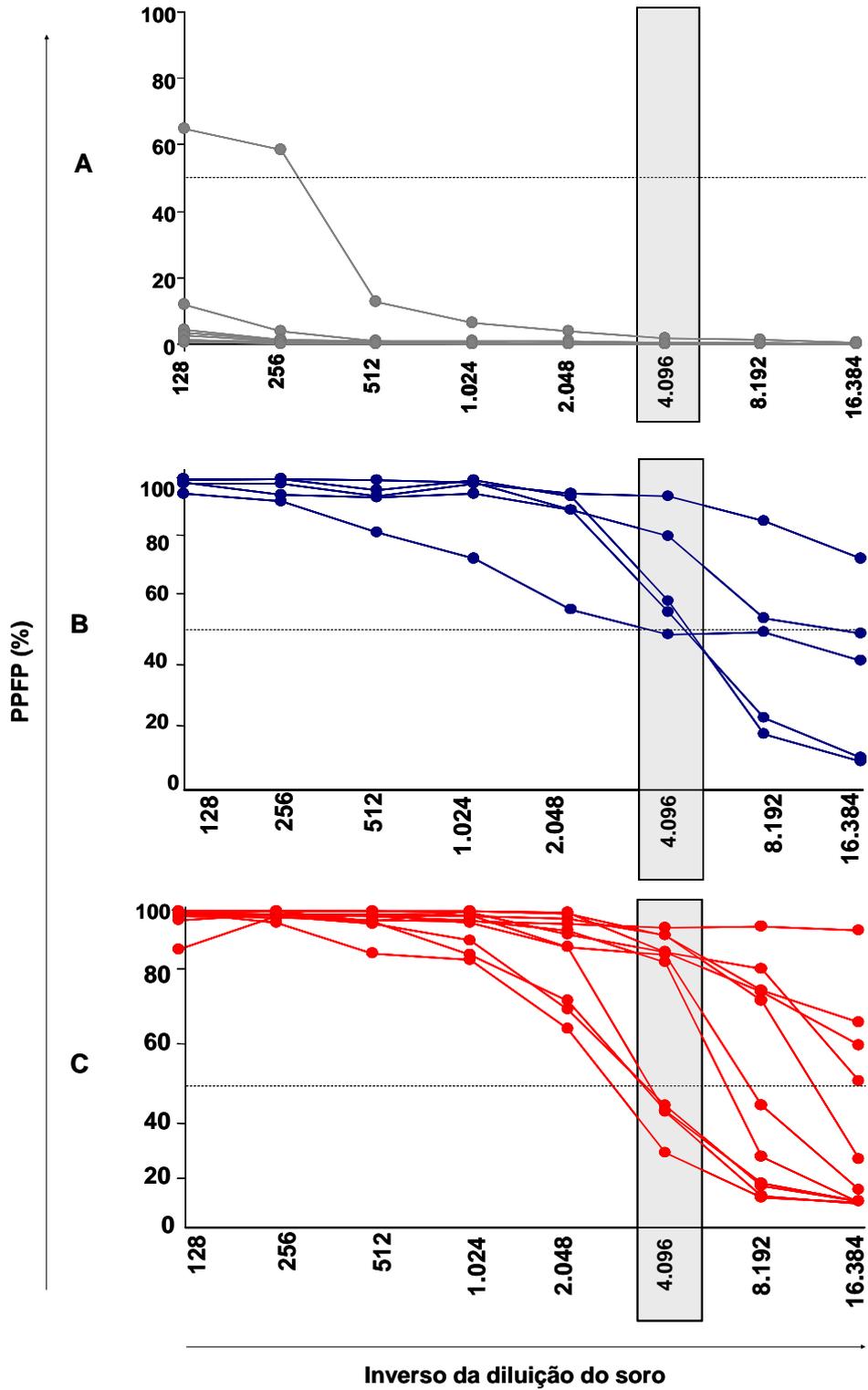


FIGURA 7-Curva de titulação de FC-ALTA IgG1, em PPFP, de soros individuais de pacientes dos grupos NI - gráfico A (n=11●), IND - gráfico B (n=5●) e CARD - gráfico C (n=11●). Os resultados da reatividade dos soros estão expressos como PPFP. Em tracejado, ponto de corte equivalente a PPFP 50%, conforme descrito em Materiais e Métodos.

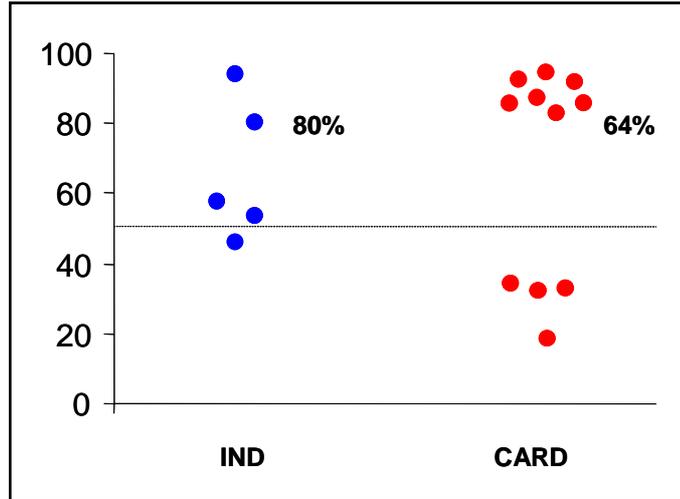


FIGURA 8 - Reatividade de IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi* em soro de pacientes chagásicos IND (n=5●), CARD (n=11●), na diluição de 1:4096. A reatividade dos anticorpos dos indivíduos está expressa como PFP, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Estudo da expressão dos receptores $Fc\gamma$ RIII (CD16), $Fc\gamma$ RII (CD32) e $Fc\gamma$ RI (CD64) na superfície de neutrófilos, monócitos e linfócitos no contexto *ex-vivo*

2.1- Estudo da expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) na superfície de neutrófilos, através da Capacidade Total de Fluorescência (CTF)

Para avaliar a expressão da molécula de CD16, CD32 e CD64 em neutrófilos do sangue periférico, foram feitos ensaios utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD16, anti-CD32 e anti-CD64 marcados com FITC e foi utilizada a estratégia de análise semiquantitativa, como descrito em Materiais e Métodos. Para avaliar a capacidade de ligação da população de neutrófilos circulantes aos anticorpos, utilizou-se a CTF obtida a partir dos dados de IMF multiplicada pelo percentual de neutrófilos circulantes determinado pelo hemograma.

Os resultados da expressão da molécula CD16, CD32 e CD64 em neutrófilos do sangue periférico dos pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas e de indivíduos não infectados estão representados na FIG.9.

A análise dos dados demonstrou que a expressão de CD16 encontra-se diminuída nos pacientes infectados, principalmente no grupo CARD, onde pudemos observar diferença significativa quando comparado com grupo NI (FIG.9A). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na expressão de CD32 (FIG.9B) e CD64 (FIG.9C). A comparação entre os grupos de pacientes infectados também não mostrou diferença significativa.

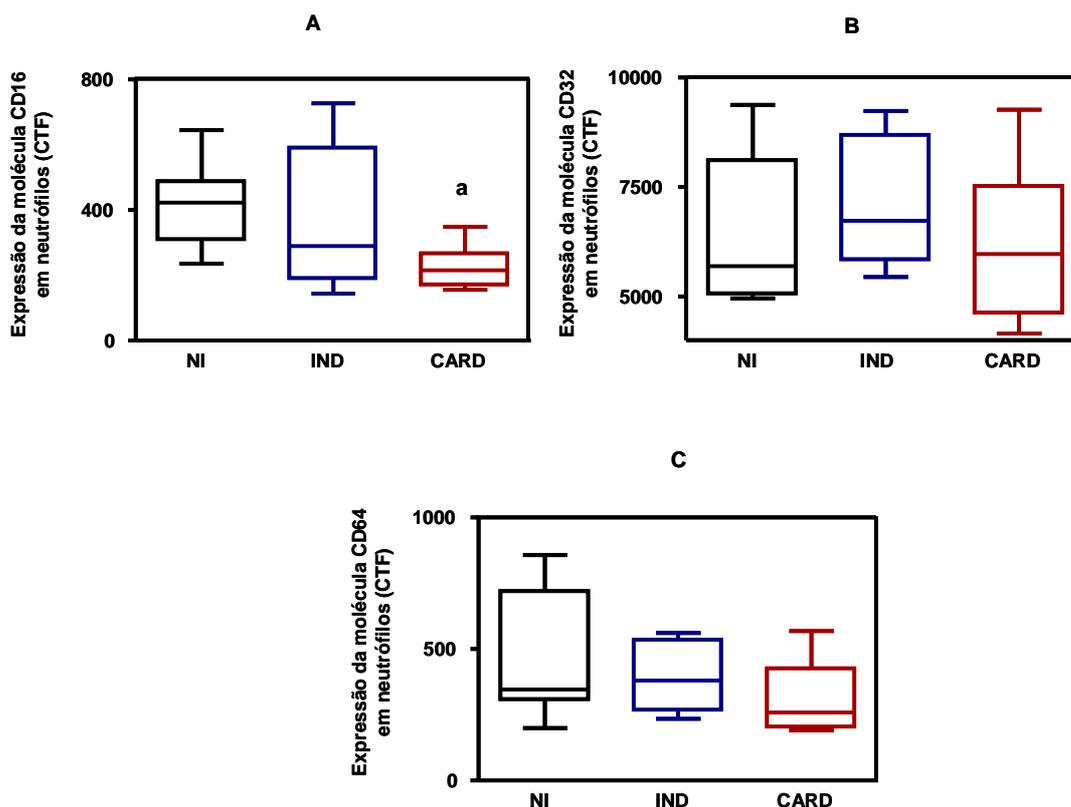


FIGURA 9 – Expressão, em CTF, das moléculas CD16 (A), CD32 (B) e CD64 (C) em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas **IND** e **CARD** e de indivíduos não infectados **NI**. A expressão das moléculas CD16, CD32 e CD64 foi analisada a partir de ensaios utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD16, anti-CD32 e anti-CD64 marcados com FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expostos em “box blot”, destacando-se o número mínimo, máximo e os quartis da expressão dos receptores. A diferença significativa ($p < 0,05$) está identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

2.2 – Estudo da expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) na superfície de monócitos, através da Capacidade Total de Fluorescência (CTF)

Simultaneamente ao realizado na população de neutrófilos, para avaliar a expressão da molécula de CD16, CD32 e CD64 em monócitos do sangue periférico foram realizados ensaios de dupla marcação, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD16, anti-CD32 e anti-CD64 marcados com FITC e anti-CD14 marcados com TC, e foi empregada a estratégia de análise da IMF de FcγR em monócitos, como descrito em Material e Métodos. A partir dos dados de IMF foi calculada a CTF da população monocítica, através do percentual obtido no hemograma.

Os resultados da expressão da molécula CD16, CD32 e CD64 em monócitos

do sangue periférico dos pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e de indivíduos não infectados estão representados na FIG.10. A análise dos dados de CD16 em monócitos demonstrou que, semelhantemente ao observado na população neutrofílica, houve queda na expressão deste receptor em ambos os grupos infectados, mas com significância no grupo CARD comparado a NI (FIG.10A) e nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi observada na expressão de CD32 (FIG.10B) e CD64 (FIG.10C). A comparação entre os grupos CARD e IND também não mostrou diferença significativa.

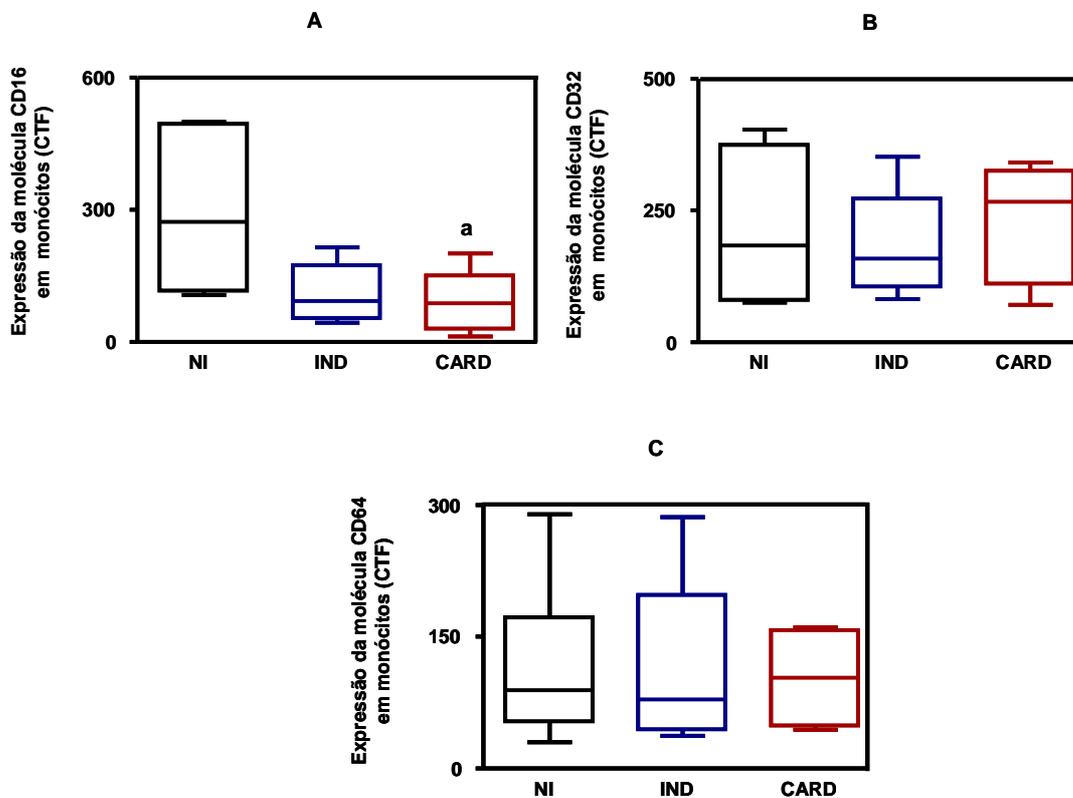


FIGURA 10– Expressão, em CTF, das moléculas CD16 (A), CD32 (B) e CD64 (C) em monócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas **IND** e **CARD** de indivíduos não infectados **NI**. A expressão das moléculas CD16, CD32 e CD64 foi analisada a partir de ensaios utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD16, anti-CD32 e anti-CD64 marcados com FITC e anti-CD14 marcado com TC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expostos em “box blot”, destacando-se o número mínimo, máximo e os quartis da expressão dos receptores. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

2.3 – Estudo da expressão dos receptores FcγRIII (CD16) e FcγRII (CD32) em linfócitos, através da Capacidade Total de Fluorescência (CTF)

Para avaliar a expressão da molécula CD16 na população de células NK, analisou-se a população de linfócitos totais do sangue periférico, uma vez que as demais populações linfocitárias não expressam este receptor.

Para avaliar a expressão da molécula CD32 em linfócitos B do sangue periférico, foram realizados ensaios de dupla marcação, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com TC e anti-CD32 marcados com FITC e foi empregada a estratégia de análise da IMF de FcγR em linfócitos B, como descrito em Material e Métodos. A partir dos dados de IMF foi calculada a CTF.

Os resultados da expressão de CD16 em linfócitos totais e CD32 em linfócitos B do sangue periférico dos pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas e de indivíduos não infectados estão representados na FIG. 11. Análise da expressão de CD16 em linfócitos totais (FIG. 11A), não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo NI, enquanto que os resultados da expressão de CD32 em linfócitos B (FIG. 11B) demonstraram maior expressão deste receptor no grupo CARD em relação ao grupo IND. A análise entre os grupos também não mostrou diferença significativa.

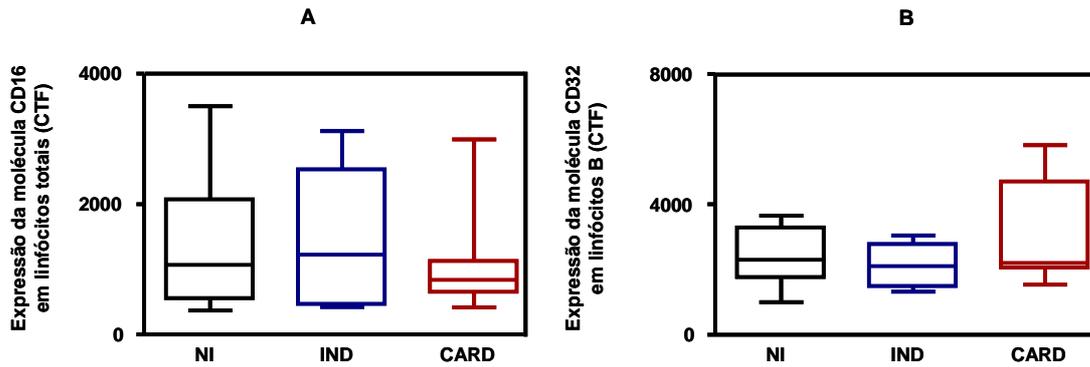


FIGURA 11- Expressão, em CTF, das moléculas CD16 (A) em linfócitos totais e CD32 (B) em linfócitos B do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas **IND** e **CARD** e de indivíduos não infectados **NI**. A expressão da molécula CD16 foi analisada a partir de ensaios utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD16 marcados com FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. A expressão da molécula CD32 foi analisada a partir de ensaios de dupla marcação, utilizando anticorpos monoclonais anti-CD32 marcados com FITC e anti-CD19 marcados com TC, segundo protocolo descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expostos em "box blot", destacando-se o número mínimo, máximo e os quartis da expressão dos receptores.

Estudo do impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) em neutrófilos após ensaios de cultura breve *in vitro*

3.1- Impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) em neutrófilos após ensaios de cultura breve *in vitro*

De forma a avaliar o papel de antígenos derivados do *T. cruzi* na indução de queda da expressão de FcγRs, foi mensurado o impacto da estimulação antígeno específica na expressão das moléculas CD16, CD32 e CD64 por leucócitos, através do cálculo da razão entre os resultados de CTF obtidos na cultura estimulada pelos valores obtidos na cultura controle (CE/CC).

Observou-se que após estímulo antigênico, houve queda na expressão de CD16, CD32 e CD64 em neutrófilos em todos os grupos analisados, fazendo com que a razão CE/CC fosse inferior a 1. Entretanto, a queda foi maior no grupo CARD, onde observou-se diferença significativa em relação ao grupo NI ($p < 0,05$) (FIG.12).

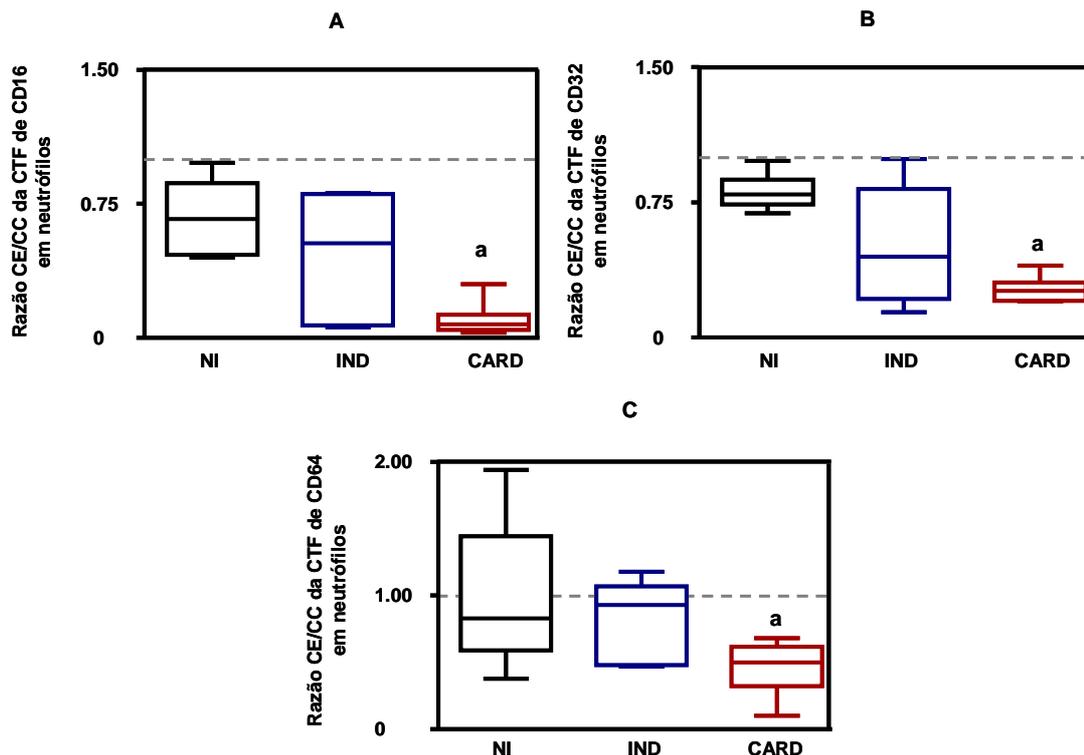


FIGURA 12– Razão da CTF da cultura estimulada/CTF da cultura controle na expressão das moléculas de CD16 (A), CD32 (B) e CD64 (C) em neutrófilos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas, **IND** e **CARD**, e de indivíduos não infectados **NI**. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD16, anti-CD32 e anti-CD64 marcados com FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expostos em “box blot”, destacando-se o número mínimo, máximo e os quartis da expressão dos receptores. A diferença significativa ($p < 0,05$) está identificada pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

3.2- Impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) e FcγRI (CD64) em monócitos após ensaios de cultura breve *in vitro*

Quando avaliamos o impacto da estimulação antígeno-específica na expressão da molécula CD16, em monócitos, verificamos que ocorreu queda no grupo CARD ($CE/CC < 1$) e aumento no grupo IND ($CE/CC > 1$) e a diferença entre as duas razões foi significativa. Já, na expressão de CD32, observou-se queda nos grupos IND e CARD, mas com significância apenas no grupo CARD, quando comparado com o grupo NI. A expressão de CD64 manteve-se inalterada após cultura em todos os grupos e, assim, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (FIG.13).

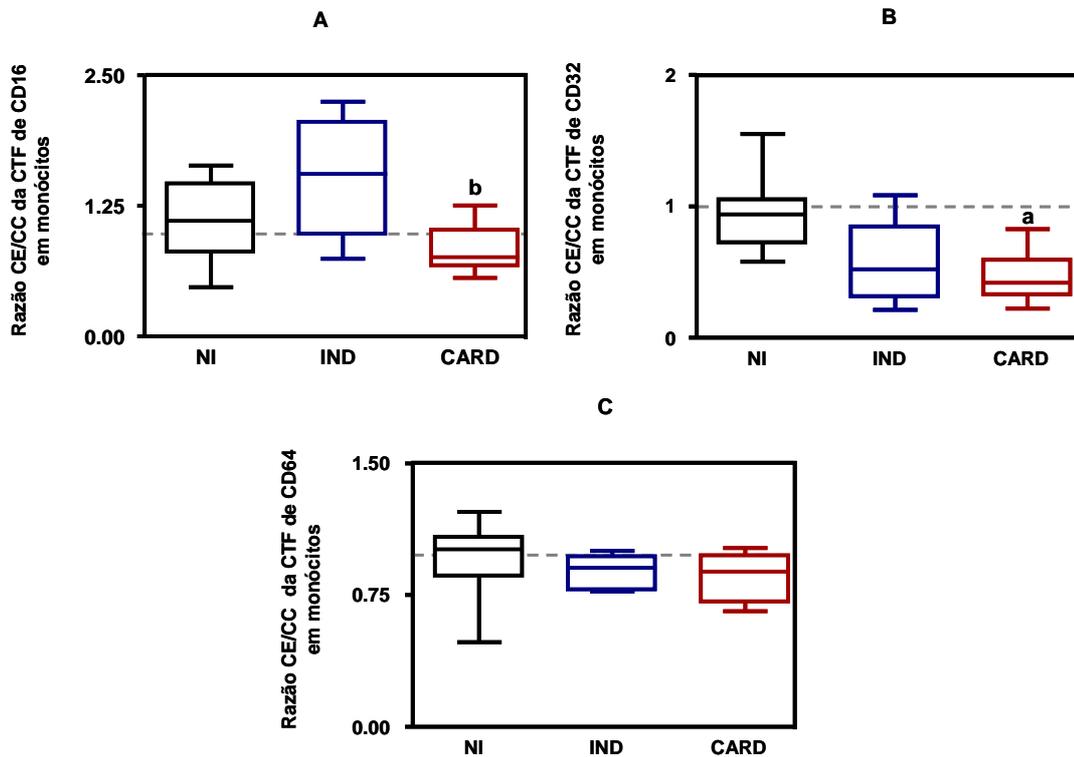


FIGURA 13– Razão da CTF da cultura estimulada/CTF da cultura controle na expressão das moléculas de CD16 (A), CD32 (B) e CD64 (C) em monócitos do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas, **IND** e **CARD**, e de indivíduos não infectados **NI**. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD16, anti-CD32 e anti-CD64 marcados com FITC e anti-CD14 marcados com TC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expostos em “box blot”, destacando-se o número mínimo, máximo e os quartis da expressão dos receptores. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI e pela letra “b” em comparação com o grupo IND.

3.3 - Impacto da estimulação antígeno específica na expressão dos receptores $Fc\gamma$ RIII (CD16) e $Fc\gamma$ RII (CD32) em linfócitos totais e linfócitos B, respectivamente, após ensaios de cultura breve *in vitro*

A razão CE/CC da CTF da molécula CD16 em linfócitos totais e de CD32 em linfócitos B do sangue periférico de pacientes portadores da doença de Chagas e de indivíduos não infectados está representada na FIG.14. A análise dos dados demonstrou que a estimulação antigênica induziu queda na expressão de CD16 em linfócitos de todos os grupos de pacientes. Entretanto, observou-se menor razão CE/CC de CTF de CD16 no grupo CARD, que apresentou-se significativamente menor que aquela do grupo NI.

Já a análise da expressão de CD32 em linfócitos B, após estimulação

antigênica, não demonstrou nenhuma diferença estatística entre os grupos avaliados.

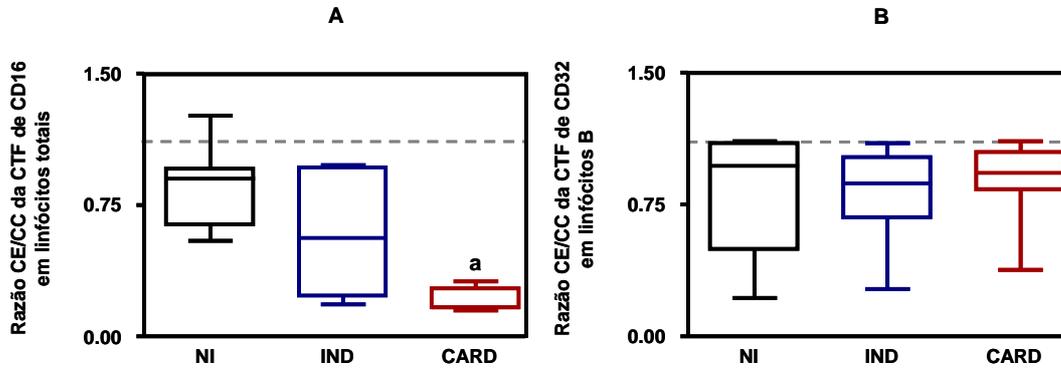


FIGURA 14- Razão da CTF da cultura estimulada/CTF da cultura controle na expressão das moléculas de CD16 (A), em linfócitos totais, e CD32 (B) em linfócitos B do sangue periférico de indivíduos portadores da doença de Chagas, **IND** e **CARD**, e de indivíduos não infectados **NI**. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD16 ou anti-CD32 marcados com FITC e anti-CD19 marcados com TC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em Material e Métodos. Os resultados estão expostos em “box blot”, destacando-se o número mínimo, máximo e os quartis da expressão dos receptores. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão identificadas pela letra “a” em comparação com o grupo NI.

Estudo da correlação entre a reatividade de IgG1 anti-*Trypanosoma cruzi* no soro de pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas e o impacto do estímulo antigênico na expressão dos receptores Fc γ RIII (CD16), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RI (CD64) na superfície de neutrófilos, monócitos e linfócitos

4.1 - Correlação da expressão de FcγR em leucócitos circulantes após estímulo antigênico com o perfil de imunoglobulinas séricas anti-*T. cruzi*

Uma vez que confirmamos menor título de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas no soro de pacientes do grupo CARD em relação ao grupo IND, procedemos à avaliação da correlação entre o nível de anticorpos anti-*T. cruzi* e a expressão dos FcγRs após estímulo antigênico. Para obtermos uma distribuição ampla de reatividade, que variasse desde ausência até alta reatividade, analisamos conjuntamente todos os indivíduos estudados: NI, IND e CARD. Verificou-se correlação negativa entre a reatividade anti-*T. cruzi* de imunoglobulinas IgG1 séricas, na diluição de 4096, com a expressão de CD16 em neutrófilos após cultura na presença de antígenos de *T. cruzi* (CE/CC)(FIG.15).(Pearson: $p=0,0016$, $r=-0,6438$).

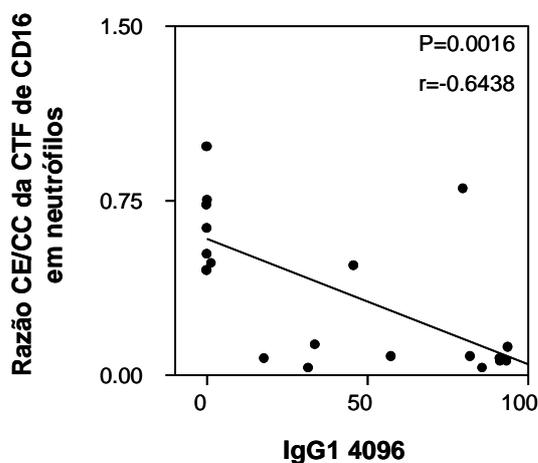


FIGURA 15 - Análise de correlação de Pearson entre os valores de PFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD16 (CTF) em neutrófilos no sangue periférico dos indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. Os valores de “r” e “p” estão inseridos na figura.

De forma análoga, a relação CE/CC da expressão de CD32 em neutrófilos demonstrou correlação negativa com o nível sérico de IgG1 anti-*T. cruzi*, na diluição de 4096 (FIG.16) (Spearman: $p=0,0105$, $r=-0,5458$).

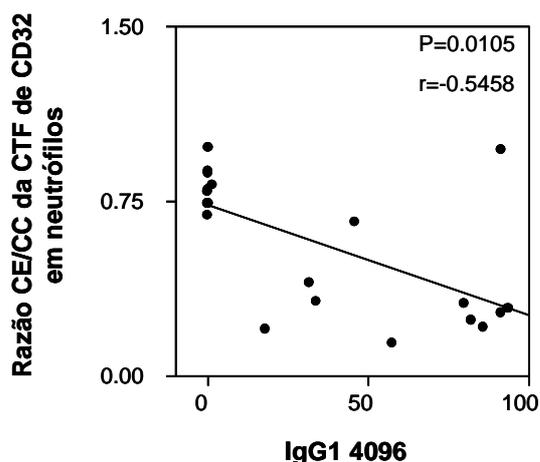


FIGURA 16- Análise de correlação de Spearman entre os valores de PPFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD32 (CTF) em neutrófilos no sangue periférico dos indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. Os valores de “r” e “p” estão inseridos na figura.

Considerando a população de monócitos, foi também observada correlação negativa entre a reatividade anti-*T. cruzi* de IgG1 séricas, na diluição de 4096, com a expressão de CD32 (FIG.17)(Pearson: $p= 0,0025$, $r= -0,6382$).

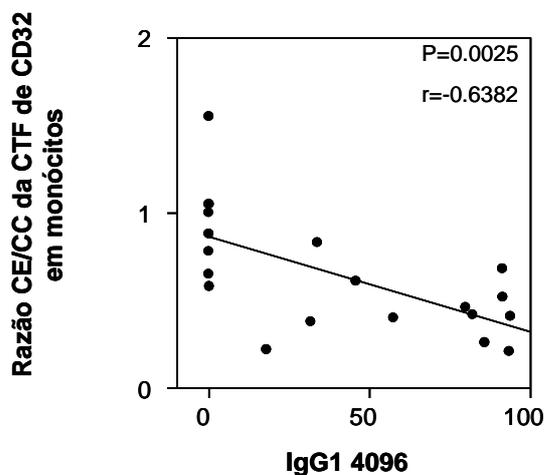


FIGURA 17- Análise de correlação de Pearson entre os valores de PPFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD32 (CTF) em monócitos no sangue periférico dos indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. Os valores de “r” e “p” estão inseridos na figura

Quando avaliou-se a população linfocitária, verificou-se também correlação negativa entre o nível sérico de IgG1, na diluição de 4096, com a expressão de CD16 em linfócitos totais (FIG.18)(Spearman: $p=0,0047$, $r= -0,5798$).

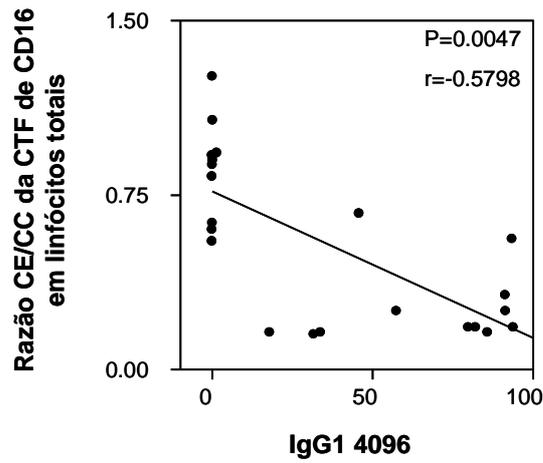


FIGURA 18 - Análise de correlação de Spearman entre os valores de PFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CD16 (CTF) em linfócitos totais no sangue periférico dos indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminadas e cardíacas da doença de Chagas. Os valores de “ r ” e “ p ” estão inseridos na figura

SÍNTESE DOS RESULTADOS

Com base nos dados obtidos foram desenvolvidas figuras que resumem os resultados significativos para expressão dos FcγRs no contexto ex-vivo e após estimulação antígeno específica *in vitro* (FIG.19) e os resultados de correlação entre o nível de anticorpos IgG1 anti-*T. cruzi* e a expressão dos FcγRs(FIG.20) .

	IND	CARD	P value
CTF Ex-vivo		▽ CD16 em Neutrófilos ^a	P<0.04
		▽ CD16 em Monócitos ^a	P<0.05
CTF CE/CC valor relativo		▽ CD16 em Neutrófilos ^a	P<0,001
		▽ CD32 em Neutrófilos ^a	P<0,001
		▽ CD64 em Neutrófilos ^a	P<0,05
		▽ CD16 em Monócitos ^b	P<0,05
		▽ CD32 em Monócitos ^a	P<0,01
		▽ CD16 em Linfócitos totais ^a	P<0,01

FIGURA 19 – Variação na expressão de FcγRs no contexto ex-vivo e após estimulação antigênica: CTF em análise ex-vivo e razão CE/CC de CTF. A orientação das setas representa diminuição estatisticamente significativa de um dos parâmetros em relação aos grupos NI e IND, indicados pelas letras “a”, “b”, respectivamente.

Correlação entre o perfil de imunoglobulinasséricas anti-<i>T. cruzi</i> e a razão CE/CC de CTF de FcγR em leucócitos circulantes			
	Teste	p value	r value
IgG1 X CD16 em neutrófilos	Pearson	P=0.0016	r =-0.6438
IgG1 X CD32 em neutrófilos	Spearman	P=0.0105	r =-0.5458
IgG1 X CD32 em monócitos	Pearson	P=0.0025	r =-0.6382
IgG1 X CD16 em linfócitos totais	Spearman	P=0.0047	r =-0.5798

FIGURA 20 - Correlação entre os valores de PFP de IgG1 na diluição 1:4096, e a razão CE/CC de CTF de Fc γ Rs em neutrófilos, monócitos e linfócitos totais no sangue periférico dos indivíduos não infectados e de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas.

DISCUSSÃO

Diversos estudos que avaliam os mecanismos imunológicos associados à manifestação de diferentes formas clínicas da doença de Chagas têm sugerido a ocorrência de eventos multifatoriais associados à combinação de múltiplos parâmetros imunológicos, dando suporte à hipótese de que mecanismos complexos estão envolvidos na patogenia chagásica. Embora muitos dos elementos envolvidos no desenvolvimento das diferentes formas clínicas já tenham sido descritos, estudos adicionais fazem-se ainda necessários para melhor compreensão da dinâmica desse processo. O estudo da participação de diferentes populações celulares nos eventos protetores e os processos patogênicos da doença chama a atenção para o envolvimento tanto da resposta imune celular como da humoral (TALVANI, *et al.*, 2004; GOMES, *et al.* 2005;

Considerando os aspectos gerais da imunidade humoral, é sabido que a ligação das imunoglobulinas aos antígenos é capaz de desencadear a neutralização de toxinas de patógenos, facilitar a ingestão por células fagocíticas (opsonização), reparar e ativar moléculas do sistema de complemento e ainda, desencadear a citotoxicidade celular mediada por anticorpos. Fagócitos são ativados por imunoglobulina G, principalmente IgG1 e IgG3, e a ativação destes pode tanto inibir a resposta inflamatória quanto causar dano tecidual. As imunoglobulinas específicas, juntamente com os FcγRs proporcionam às células acessórias, neutrófilos e monócitos, habilidade para remover patógenos e seus produtos do ambiente extracelular por fagocitose, endocitose de imunocomplexos, liberação de mediadores inflamatórios, ADCC e apresentação de antígenos.

Em se tratando da doença de Chagas, estudos anteriores haviam demonstrado a presença de altos títulos de IgG1 anti-formas tripomastigotas vivas em pacientes portadores da forma indeterminada quando comparados com indivíduos portadores da forma clínica cardíaca (CORDEIRO *et al.*, 2001). No presente estudo, a análise dos dados demonstraram que, na diluição de 1:4096, pacientes da forma indeterminada também apresentavam alta reatividade, reforçando a hipótese de que a maior concentração de anticorpos líticos estaria relacionada com melhor evolução da infecção. Nos pacientes da forma cardíaca, observou-se dois perfis de reatividade, permitindo evidenciar dois grupos: pacientes com alta reatividade e pacientes com baixa reatividade. É possível que aqueles pacientes com maior concentração de anticorpos sejam portadores de formas

cardíacas menos graves, entretanto, por limitações na propedêutica empregada na classificação dos pacientes, não foi possível esclarecer tal hipótese.

Se considerarmos os níveis elevados de anticorpos específicos para o *T. cruzi*, como benéficos para o indivíduo infectado, podemos propor que uma elevada atividade citotóxica mediada por anticorpos (ADCC) poderia ser fundamental no controle da parasitemia e conseqüentemente numa menor intensidade do processo patológico, no foco inflamatório tecidual. Assim, além do papel protetor dos anticorpos líticos previamente descrito (KRETTLI & BRENER, 1982), uma maior interação das células NK com alvos revestidos por anticorpos, predominantemente IgG1, poderia ser um mecanismo importante no controle da morbidade da infecção crônica pelo *T. cruzi*. Apesar dos nossos resultados não terem demonstrado nenhuma diferença significativa em células NK.

Estudos prévios (LAGUNES *et al.*, 1989, VELGE *et al.*, 1991) relatam a importância dos mecanismos de ADCC na infecção chagásica. Embora eventos de ADCC, no contexto da doença de Chagas tenham sido investigados por diversos autores, os resultados desses estudos são ainda controversos no que se refere à natureza protetora ou indutora de patologia. Dentro desta linha, alguns estudos focalizaram a atenção aos eventos de ADCC, associados à imunopatologia da infecção, através de mecanismos de dano causado a cardiomiócitos *in vitro*, por linfócitos de hospedeiros não infectados (VELGE *et al.*, 1991). Outros estudos relatam a importância de ADCC nos eventos de dano tecidual, sugerindo sua participação em eventos de auto-imunidade na doença de Chagas (BRAUN & TITTO, 1985).

No entanto, outros investigadores relatam que os anticorpos, principalmente os AL, são importantes na indução de ADCC anti-formas tripomastigotas do *T. cruzi*, e defendem a hipótese do papel protetor desse mecanismo mediado por linfócitos (LIMA-MARTINS *et al.*, 1985). Devido à complexidade e ao caráter contraditório desses achados, torna-se difícil estabelecer o papel da ADCC no contexto da infecção pelo *T. cruzi*. Acreditamos que mecanismos múltiplos de ADCC possam estar atuando de forma diferenciada, acoplando eventos protetores ou indutores de danos teciduais, envolvendo diferentes anticorpos, bem como diferentes tipos celulares. Entretanto acreditamos que o papel de NK na infecção chagásica crônica

esteja predominantemente associado a eventos protetores, especialmente na fase aguda da infecção, quando ocorrem as maiores parasitemias.

Outros estudos relatam que, dentre os leucócitos circulantes, a principal fração responsável pela ADCC seriam os polimorfonucleares (OLABUENAGA *et al.*, 1979). Ressalta-se que, em nosso estudo, entre todos os FcγRs, o CD16 em neutrófilos foi o que apresentou maior redução de expressão. Ademais, é possível que também a fagocitose possa estar comprometida. É descrito que CD16, o mais abundante receptor de IgG na superfície dos neutrófilos, não medeia diretamente a fagocitose, mas coopera na função fagocítica mediada pelo FcγRIIIa (SALMON *et al.*, 1991).

Esses resultados nos incitaram a pesquisar o impacto da estimulação antígeno específica na expressão destes receptores.

A estimulação antígeno específica, em cultura de células de sangue total de curta duração, compreende uma interessante estratégia experimental que, ao favorecer o contato de diferentes populações celulares com antígenos solúveis da forma tripomastigota do *T. cruzi*, de certa forma mimetiza o tecido infectado onde observa-se maior concentração de antígenos parasitários. Através desse ensaio, observamos uma deficiência seletiva na expressão de receptores de IgG em populações da imunidade inata (neutrófilos, monócitos e linfócitos NK) em pacientes portadores da doença de Chagas, especialmente naqueles da forma cardíaca.

Esses dados estão de acordo com observações anteriores de Silva (1999) sobre a habilidade do antígeno de *T. cruzi* em modular a expressão de FcγRIII na superfície de células NK e neutrófilos, em ensaios de cultura *in vitro*. Esse autor propõe que esse efeito seja mediado pela capacidade do antígeno do *T. cruzi* de clivar a porção “Ig-like” dos receptores de IgG (característica intrínseca da superfamília de FcγR) por meio da ação da cruzipaina expressa pelo parasito.

A cruzipaina é a cisteína proteinase majoritária do *T. cruzi*, sendo essa um fator de virulência do parasita importante na interação parasito-hospedeiro, essencial para a invasão e o crescimento intracelular do parasita (SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; APARICIO *et al.*, 2004). É uma enzima do tipo catepsina L/B da família da papaína, secretada na forma ativa para o meio extracelular e abundantemente expressa em todas as fases do ciclo de vida do parasita. Além de gerar peptídeos que estimulam a internalização de tripomastigotas por células cardiovasculares, a atividade

enzimática da cruzipaina é essencial para o desenvolvimento e diferenciação de amastigotas intracelulares. Estudos recentes indicam que a cruzipaina gera peptídeos pró-inflamatórios nos sítios de infecção, alertando as células sentinelas do sistema imune inato sobre a presença de tripomastigotas no tecido intersticial (SCHARFSTEIN *et al*, 2007).

Cazzulo e colaboradores em 1997 determinaram a sequência de 130 ácidos aminados do domínio C-terminal da cruzipaina. Contendo vários sítios preditivos de N/O-glicosilação, esta extensão C-terminal une-se ao domínio catalítico (central) através de uma sequência (tipo-dobradiço) rica em treonina e prolina. O sequenciamento completo de clone de DNA genômico mostrou que a cruzipaina é um polipeptídeo de cadeia única sintetizada como uma pre-pro-enzima. A região PRE é composta por um peptídeo hidrofóbico capaz de direcionar a molécula para o retículo endoplasmático. Tal como ocorre com outros membros da superfamília papaína, o segmento PRO-peptídico é fundamental para o processo de enovelamento da proteína precursora. Além disso, segmento PRO liga-se ao domínio catalítico de diversas enzimas da família papaína, obstruindo o acesso de substratos ao seu interior da fenda catalítica. Estudos com pacientes indicaram que os epitopos reconhecidos pelas células T concentram-se no domínio central (catalítico), enquanto que os epitopos reconhecidos por anticorpos IgG humanos se concentram no domínio C-terminal (FONSECA *et al.* , 2005). Dessa forma, a ligação de anticorpos à cruzipaina é capaz de manter a função catalítica da proteinase.

É sabido que o processo de interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira é um processo de interação entre ligante-receptor. Possivelmente, logo após a adesão ocorrem modificações nas membranas do parasita e da célula hospedeira. Tem sido sugerido que as proteases do parasita estejam envolvidas no processo. Estudos demonstraram que a inibição de proteinases, como a cruzipaina, por inibidores específicos reduz significativamente o processo de invasão da célula hospedeira pela forma tripomastigota (ARAÚJO-JORGE, 1989). Ainda, incubação de formas tripomastigotas na presença da porção Fab de imunoglobulina G que reconhece a cruzipaina inibe a infecção de macrófagos (SOUTO-PADRON *et al.*, 1990). Esse últimos achados também reforçam o papel de anticorpos anti-formas tripomastigotas como fator de proteção de uma infecção grave, seja intensificando a lise das formas parasitárias através da ADCC, seja dificultando a invasão celular por bloqueio de

proteases.

Outro mecanismo que poderia explicar a redução da expressão de FcγRs diante da presença de antígenos do *T. cruzi*, seria a ligação do imunocomplexo aos receptores de IgG que poderia induzir a internalização do complexo ligante/receptor. Estudos prévios demonstram que o FcγRI é essencial no reconhecimento e apresentação de antígenos através da internalização de antígenos complexados por IgG *in vitro* (GOSSELIN *et al.*, 1992). Além da ativação celular, os FcγR que contém ITAM induzem a internalização dos seus ligantes, que podem ser imunocomplexos solúveis, os quais são endocitados por todos os tipos celulares, ou podem ser imunocomplexos particulados, internalizados somente por células fagocíticas (DAERON M, 1997). Observa-se ainda que o FcγRIIIa é o principal receptor fagocítico expresso em polimorfonucleares e são capazes de induzir internalização de imunocomplexos, degranulação e liberação de mediadores inflamatórios (STEFANESCU *et al.*, 2004).

Em diversas situações clínicas, investigações abordando o papel de FcγRs já foram realizadas. Na sua grande maioria, os estudos apontam para uma maior expressão de FcγRs na presença de infecções.

Alguns autores propõem a análise da expressão de CD64 (FcγRI) em neutrófilos e monócitos como teste diagnóstico auxiliar para avaliação de infecções bacterianas e sepsis (NUUTILA *et al.*, 2007). Observa-se ainda que uma defesa eficiente do hospedeiro contra *Streptococcus pneumoniae* depende da fagocitose mediada por imunoglobulina G de bactérias e o polimorfismo de CD32 (FcγRIIIa) determina a capacidade fagocítica (YUAN *et al.*, 2003). Segundo Castelli (2004), infecções virais provocadas pelo adenovírus e pelo vírus Epstein–Barr também induzem aumento da expressão de CD64 em neutrófilos.

Também o receptor CD16 (FcγRIIIa) em monócitos tem se mostrado aumentado em diferentes condições patológicas como: câncer, sepsis, asma, infecção pelo HIV e progressão da AIDS (ZIEGLER-HEITBROCK, 1996). Interessantemente, na leishmaniose cutânea, já foi relatado aumento da expressão deste receptor em monócitos, diretamente proporcional ao tamanho da lesão (SOARES *et al.*, 2006).

Considerando as doenças auto-imunes, a ativação de receptores Fcγ parece apresentar um papel importante na reação inflamatória na artrite reumatóide.

Estudos sugerem que o balanço entre as funções inibitórias, exercidas pelo FcγRIIb, e as ativadoras, exercidas pelos FcγRs do tipo I, IIa, and IIIa, determina a magnitude da resposta celular durante o curso da doença (MAGNUSSON *et al.*, 2007). Estudo recente demonstrou que a inibição de TNF-α é capaz de reduzir o processo inflamatório em pacientes com artrite reumatóide, uma vez que essa citocina exacerba a expressão de FcγRIIIa em neutrófilos e amplifica a ativação de neutrófilos induzida por imunocomplexos (BELOSTOCKI *et al.*, 2008). Tais achados colaboram para explicar o benefício clínico obtido em pacientes com artrite reumatóide em uso de inibidores de TNF-α, como o infliximab.

Considerando nosso estudo presente, embora aspectos funcionais celulares não tenham sido focalizados, nossos dados confirmam a existência de menor expressão de FcγR em pacientes portadores da forma clínica mais grave da doença de Chagas e apontam para o papel de antígenos derivados do *T. cruzi* na modulação da expressão dos receptores. A associação destes achados com o encontro de menores títulos de anticorpos anti-formas tripomastigotas vivas nos pacientes cardiopatas sinaliza que a morbidade na doença de Chagas esteja relacionada com uma menor capacidade de clareamento parasitário via ADCC e conseqüente maior parasitemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-APARICIO IM, SCHARFSTEIN J, LIMA AP. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect Immun.*;72(10):5892-902, 2004.
- 2-ARAÚJO-JORGE TC. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;84(4):441-62,1989.
- 3- ARAÚJO-JORGE T, RIVERA MT, el BOUHDIDI A, DAËRON M, CARLIER Y. An Fc gamma RII-, Fc gamma RIII-specific monoclonal antibody (2.4G2) decreases acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* Nov;61(11):4925-8,1993.
- 4- ARAÚJO-JORGE T, el BOUHDIDI A, RIVERA MT, DAËRON M, CARLIER Y, JORGE TA [corrected to Caraujo-Jorge T. *Trypanosoma cruzi* infection in mice enhances the membrane expression of low-affinity Fc receptors for IgG and the release of their soluble forms. *Parasite Immunol.* Sep;15(9):539-46,1993. Erratum in: *Parasite Immunol* Jan;16(1):10, 1994.
- 5-BELOSTOCKI K, PRICOP L, REDECHA PB, AYDIN A, LEFF L, HARRISON MJ, SALMON JE. Infliximab treatment shifts the balance between stimulatory and inhibitory Fc γ receptor type II isoforms on neutrophils in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31;58(2):384-388, 2008.
- 6-BERTELLI MS, GOLGHER RR, BRENER Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. *J Parasitol.* ;63(3):434-7,1977.
- 7- BRAUN M, de TITTO E. [Immune response to *Trypanosoma cruzi*. An approach to the pathogenesis of Chagas' disease] *Acta Physiol Pharmacol Latinoam.*;35(1):1-47,1985.
- 8- BRENER Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol.* 18:247-92, 1980.
- 9- BRENER Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: Brener Z, Andrade ZA (orgs) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1-41, 1979.
- 10- BRENER Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 27:347-82, 1973.
- 11- CHAGAS C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypaum cruzi* n.gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1:159-218, 1909.
- 12-CAMARGO MM, ANDRADE AC, ALMEIDA IC, TRAVASSOS LR, GAZZINELLI RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania*

species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol.*, 15;159(12):6131-9,1997.

13-CASTELLI, G.P., POGNANI, C., MEISNER, M., STUANI, A., BELLOMI, D., SGARBI, L., Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit. Care* 8, R234, 2004.

14-CAZZULO JJ, STOKA V, TURK V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol Chem.*;378(1):1-10, 1997.

15-CHANDRASEKAR B, MELBY PC, TROYER DA, COLSTON JT, FREEMAN GL. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.*;152(4):925-34,1998.

16-CORDEIRO FD, MARTINS-FILHO OA, DA COSTA ROCHA MO, ADAD SJ, CORREA-OLIVEIRA R, ROMANHA AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 8(1):112-8, 2001.

17-COURA, JR et al. Chagas' disease in Brazilian Amazon.II. A serological survey. *Rev Inst Med Tro, São Paulo*, (37):103-7,1995.,

COUTINHO CM, CAVALCANTI G, Damatta RA, VAN LEUVEN F, ARAÚJO-JORGE TC. Alpha-2-macroglobulin receptor is differently expressed in peritoneal macrophages from C3H and C57/B16 mice and up-regulated during *Trypanosoma cruzi* infection.

18 -DAËRON M. Structural bases of FcγR function. *Int Rev Immunol.*; 16:1-27, 1997.

19- DIAS JCP, COURA JR. Epidemiologia. In: DIAS, COURA JR (EDS). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para clínica geral. Rio de Janeiro:FIOCRUZ editora, 33-66, 1997.

20-DIAS JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (eds). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan. 49-71, 2000.

21-DIAS, JCP. MACÊDO VO, Doença de Chagas. In: Coura, JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005.

22-DIAS J & SCHOFIELD C., The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*;94,(1):103-21,1999.

23-Drugs for neglected diseases initiative (DNDi). Doença de Chagas. Disponível em http://www.dndi.org.br/portuguese/doença_chagas.aspx. Acesso em 25 e outubro de 2007.

- 24- FLORES-BORJA F, SANTIAGO E & WEISS-STEIDER B. Receptores Fcγ em salud y enfermedad. Rev. Invest Clin. 50:529-40, 1998.
- 25- FONSECA SG, MOINS-TEISSERENC H, CLAVE E, IANNI B, NUNES VL, MADY C, IWAI LK, SETTE A, SIDNEY J, MARIN ML, GOLDBERG AC, GUILHERME L, CHARRON D, TOUBERT A, KALIL J, CUNHA-NETO E. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8⁺ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. Microbes Infect., 7(4):688-97, 2005.
- 26- GALVAO LM, NUNES RM, CANCADO JR, BRENER Z, KRETTLI AU. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 87(2):220-3, 1993.
- 27- GARCIA ES, AZAMBUJA P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitol Today. 7: 240-244, 1991.
- 28- GAZZINELLI RT, TALVANI A, CAMARGO MM, SANTIAGO HC, OLIVEIRA MA, VIEIRA LQ, MARTINS GA, ALIBERTI JC, SILVA JS. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. Braz. J Med Biolo Res. 31(1):89-104,1998.
- 29- GESSNER JE, HEIKEN H, TAMM A, SCHMIDT RE. The IgG Fc receptor family., Ann Hematol.;76(6):231-48, 1998.
- 30- GOMES JA, BAHIA-OLIVEIRA LM, ROCHA MO, BUSEK SC, TEIXEIRA MM, SILVA JS, CORREA-OLIVEIRA R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. Infect Immun. Dec;73(12):7960-6, 2005.
- 31- GOSSELIN, E.J., WARDWELL, K., GOSSELIN, D.R., ALTER, N., FISHER, J.L., GUYRE, P.M., Enhanced antigen presentation using human Fc gamma receptor (monocyte/macrophage)-specific immunogens. J. Immunol. 149, 3477, 1992.
- 32- HATCHER FM, Kuhn RE, CERRONE MC, BURTON RC. Increase natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. J Immunol., 127:1126-1130,1981.
- 33- JANEWAY CA Jr. How the immune system protects the host from infection. Microbes Infect., 3(13):1167-71, 2001.
- 34- JUNQUEIRA AC.V. et al., Chagas' disease in the Brazilian Amazon. Simpósio Internacional sobre avanços do conhecimento da Doença de Chagas 90anos após sua descoberta, (Resumos). Rio de Janeiro, abril,1999.
- 35- KIPNIS TL, JAMES SL, SHER A, DAVID JR., Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. Am J Trop Med Hyg.;30(1):47-53,1981.

- 36- KRETTLI AU, BRENER Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J Immunol.; 128(5):2009-12, 1982.
- 37- LAGUNES RP, CABEZA-MECKERT PM, CHAMBO JG. Immunologic studies on murine modelo of Chagas disease. Medicina (B Aires), 49(3):197-202,1989.
- 38- LARANJA FS. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. Ver. Bras. Méd.10:482,1953.
- 39- LIMA-MARTINS MV, SANCHEZ GA, KRETTLI AU, BRENER Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. Parasite Immunol.; 7(4):367-76,1985.
- 40- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.;193:265-275,1951.
- 41- MAGNUSSON SE, ENGSTRÖM M, JACOB U, ULFGREN AK, KLEINAU S. High synovial expression of the inhibitory FcγRIIb in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 9(3):R51, 2007.
- 42- MARTINS-FILHO OA, PEREIRA MES, CARVALHO JF, CANÇADO JR, BRENER Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2: 569-573, 1995.
- 43- MARZOCCHI-MACHADO & LUCISANO-VALIN. Receptores para imunoglobulina G (FcγR). Medicina (Ribeirão Preto); 38(1): 82-95, 2005.
- 44- NUUTILA J, HOHENTHAL U, LAITINEN I, KOTILAINEN P, RAJAMÄKI A, NIKOSKELAINEN J, LILIUS EM. Simultaneous quantitative analysis of FcγRI (CD64) expression on neutrophils and monocytes: a new, improved way to detect infections. J Immunol Methods., 1;328(1-2):189-200, 2007.
- 45-OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Consultado a partir de <http://paho.org/spanish/ad/dpc/cd/chagas.htm>, em 20 de dezembro de 2007.
- 46- OLABUENAGA SE, CARDONI RL, SEGURA EL, RIERA NE, DE BRACCO MM., Antibody-dependent cytolysis of *Trypanosoma cruzi* by human polymorphonuclear leukocytes. Cell Immunol.; 45(1):85-93,1979.
- 47-ORTIZ –ORTIZ L, ORTECA T, CAPIN R, MARTINEZ T, Enhanced molecular phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Int Arch Allergy Appl Immunol, 50:232-242, 1976.
- 48-PAPAZAHARIADOU M, ATHANASIADIS GI, PAPADOPOULOS E, SYMEONIDOU I, HATZISTILIANOU M, CASTELLANI ML, BHATTACHARYA K, SHANMUGHAM LN, CONTI P, FRYDAS S., Involvement of NK cells against tumors and parasites.Int J Biol Markers, 22(2):144-53, 2007.

- 49-PLATA F, WIETZERBIN J, PONS FG, FALCOFF E, EISEN H. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. Eur J Immunol. Oct;14(10):930-5,1984.
- 50-PLEASS RJ & WOOF JM. Fc receptors and immunity to parasites. Trends in Parasitology. Vol. 17 No.11, 2001.
- 51- RAVETCH JV, LUSTER AD, WEINSHANK R, KOCHAN J, PAVLOVEC A, PORTNOY DA, HULMES J, PAN YC, UNKELESS JC. Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. Science, 7;234(4777):718-25, 1986.
- 52- RAVETCH JV & KINET J. Fc receptors. Annual Reviews Immunol.; 9:457-92, 1991.
- 53-REZENDE JM & MOREIRA H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: Brener,Z. et al., *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas.2ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.
- 54-REZENDE JM; RASSI A. Doença de Chagas.In: Castro,LP;CUNHA, AS; REZENDE, JM.Protozooses Humanas.São Paulo, Fundo editorial Byk,1994.
- 55- REY, L. Parasitologia. 3ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.
- 56-RIBEIRO-GOMES FL, SILVA MT, DOSREIS GA.Neutrophils, apoptosis and phagocytic clearance: an innate sequence of cellular responses regulating intramacrophagic parasite infections.Parasitology.;132 Suppl:S61-8, 2006.
- 57-RIMOLDI MT, OLABUENAGA SE, DE BRACCO MM. Phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* by human polymorphonuclear leukocytes. J Protozool.; 28(3):351-4,1981.
- 58- ROCHA MO, RIBEIRO AL, TEIXEIRA MM. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. Frontiers in Bioscience 8, 44-54, 2003.
- 59-ROCHA RD, GONTIJO CM, SANTOS SM, CARVALHO AT, FERRARI TC, OLIVEIRA RC, MARQUES MJ, MAYRINK W, MARTINS-FILHO OA. Performance analysis of the research of IgG antibodies alive promastigote anti-forms of *Leishmania (V.) braziliensis* (AAPV-IgG), for flow cytometry in the diagnosis of the leishmaniasis american tegumentar, Rev Soc Bras Med Trop.;36 Suppl 2:15-8, 2003.
- 60-SALMON J.E., MILLARD S.S., BROGLE N.L., KIMBERLLY R.P.. Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in a oxidant-dependent and allele-sensitive manner. J. Clin. Invest 95(6)2877-85, 1995.
- 61-SATHLER-AVELAR R, LEMOS EM, REIS DD, MEDRADO-MERCADO N, ARAÚJO-JORGE TC, ANTAS PR, CORREA-OLIVEIRA R, TEIXEIRA-CARVALHO A, ELÓI-SANTOS SM, FAVATO D, MARTINS-FILHO OA. Phenotypic features of

peripheral blood leucocytes during early states of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Scand J Immunol.; 58(6):655-663, 2003.

62-SCHARFSTEIN J, SCHMITZ V, SVENSHÖ E, GRANATO A, MONTEIRO AC. Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an endogenous danger signal driving dendritic cell maturation, Scand J Immunol.; 66(2-3):128-36, 2007.

63-SCHARFSTEIN J, SCHMITZ V, MORANDI V, CAPELLA MM, LIMA AP, MORROT A, JULIANO L, MÜLLER-ESTERL W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors, J Exp Med., 6;192(9):1289-300, 2000.

64-SILVA CL. Clivagem in vitro do receptor FcγRIII na superfície de leucócitos humanos: uma nova abordagem para o diagnóstico da Doença de Chagas. Monografia. Biociências. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1999.

65-SILVA JS, MORRISSEY PJ, GRABSTEIN KH, MOHLER KM, ANDERSON D, REED SG. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J Exp Med., 1;175(1):169-74, 1992.

66- SILVEIRA A.C. & LINHAES M., Chagas disease: the epidemiological and control aspects. Rev Soc Bras Med Trop , 31, (2):15-60, 1998.

67- SOUTO-PADRÓN T, CAMPETELLA OE, CAZZULO JJ, de SOUZA W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. J Cell Sci., 96 (3):485-90, 1990.

68- SOUZA W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral Neto M (orgs) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 88-126, 2000.

69- STEFANESCU RN, OLFERIEV M, LIU Y, PRICOP L., Inhibitory Fc gamma receptors: from gene to disease. J Clin Immunol.; 24(4):315-26, 2004.

70- Talvani A, Rocha MO, Ribeiro AL, Correa-Oliveira R, Teixeira MM. Chemokine Receptor Expression on the Surface of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Chagas Disease. Infect Dis. Jan 15;189(2):214-20, 2004.

71- TORRICO F, HEREMANS H, RIVERA MT, VAN MARCK E, BILLIAU A, CARLIER Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J Immunol., 15;146(10):3626-32, 1991.

72- VAN DEN HERIK-OUDIJK IE, TER BEKKE MW, TEMPELMAN MJ, CAPEL PJ, VAN DE WINKEI JG. Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. Blood., 1;86(9):3302-7, 1995.

- 73- VELGE P, KUSNIERZ JP, OUAISSI A, MARTY B, PHAM BN, CAPRON A. *Trypanosoma cruzi*: infection of T lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Eur J Immunol., 21(9):2145-52, 1991.
- 74- VINHAES M.C. & DIAS J.C. Chagas disease in Brazil, Cad Saude Publica.;16 (2):7-12, 2000.
- 75- VITELLI D. M. Estudo da resposta imune de pacientes portadores de diferentes formas clínicas: ênfase em aspectos celulares e moleculares do sangue periférico. Dissertação de Mestrado. 2004.
- 76- ZHOU MJ, BROWN EJ. CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. J Cell Biol.;125(6):1407-16, 1994.
- 77- ZIEGLER-HEITBROCK, H. W., Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation Immunol. 17,424-428, 1996.
- 78- YUAN FF, WONG M, PERERVA N, KEATING J, DAVIS AR, BRYANT JA, SULLIVAN JS. FcγRIIA polymorphisms in *Streptococcus pneumoniae* infection. Immunol Cell Biol.,81(3):192-5, 2003.
- 79- WATSON F, GASMI L, EDWARDS SW, Stimulation of intracellular Ca²⁺ levels in human neutrophils by soluble immune complexes. Functional activation of Fc gammaRIIIb during priming, J Biol Chem, 272(29)17944-51, 1997.
- 80- WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 905:I-VI, 1-109, 2002.