

ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS ER-MP58⁺ NA PRODUÇÃO DE IL-12 EM LINFONODOS DRENANTES DA INFECÇÃO INICIAL POR *Leishmania major* EM CAMUNDONGOS BALB/C ¹

Ludimila Paula Vaz Cardoso

O desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 é o evento chave para prevenir a infecção murina por *Leishmania* e está interligado à produção de IL-12 por monócitos, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. A sinalização via IL-12 aumenta a produção de IFN- γ por células T, favorecendo o perfil Th1 da resposta imune e o fenótipo de resistência à infecção. No hospedeiro vertebrado, a leishmania reside em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), o qual também é responsável pela eliminação do parasito. A participação de células indiferenciadas do SFM na produção de IL-12 vem sendo discutida. Ficou demonstrado recentemente que uma população de fagócitos mononucleares, derivados de cultura de medula óssea e expressando o marcador ER-HR3, produzia grande quantidade de IL-12p40 após estimulação *in vitro* com formas procíclicas ou metacíclicas de *L. (L.) major*. A produção de IL-12 na infecção por *L. (L.) major*, por fagócitos em diferentes estágios de maturação *in vivo*, ainda não está clara. Neste trabalho, avaliamos, quanto à produção de IL-12p40, o envolvimento de células em diferentes estágios de maturação em linfonodos drenantes após 48 horas de infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c. Verificamos que células CD31⁺ (precursoras de fagócitos mononucleares) estão ausentes nos linfonodos drenantes do sítio do inóculo e que o número de células ER-HR3⁺ (fagócitos mononucleares em estágio intermediário de maturação), células ER-MP58⁺ (fagócitos imaturos) e 33D1⁺ (subpopulações de células dendríticas) aumenta no período de 48 horas após a infecção. Observamos também que células ER-MP58⁺ são as principais responsáveis por grande parte da produção de IL-12 nos linfonodos drenantes 48 horas após a infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c. Sugerimos, portanto, que, *in vivo*, a população ER-MP58⁺ juntamente com as outras populações celulares, conhecidas como produtoras de IL-12, têm um papel relevante na inflamação induzida pelo inóculo parasitário.

1 Resumo de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás, sob a orientação do Prof. Dr. Milton Adriano Pelli De Oliveira e co-orientação da Prof. Dra. Glória Maria Collet de Araújo Lima, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: Imunologia. Goiânia, GO, Brasil, 2005.

INVOLVEMENT OF ER-MP58⁺ IN IL-12 PRODUCTION BY DRAINING LYMPH NODES OF INITIAL INFECTION BY *Leishmania major* IN BALB/C MICE ¹

The development of a Th1 immune response is the key event to prevent *Leishmania* infection and is linked with the IL-12 production by monocytes, dendritic cells, macrophages and neutrophils. The IL-12 signal induces the increase of IFN- γ production by T cells, favoring the profile of the Th1 immune response and the resistance phenotype to the infection. In the vertebrate host, the leishmania inhabits cells of the mononuclear phagocyte system (MPS), which are also responsible for the elimination of the parasite. The participation of immature cells of MPS in the initial production of IL-12 has been discussed. It was demonstrated recently that a population of mononuclear phagocytes, derived from bone marrow culture and expressing the marker ER-HR3 produced great amount of IL-12p40 after stimulation *in vitro* with procyclic or metacyclic promastigotes of *L. (L.) major*. The initial production of IL-12 by MPS cells is under investigation. The role of mononuclear phagocytes in the production of IL-12p40 *in vivo*, in different stages of maturation, is still unclear. In this work, we evaluated the involvement of MPS cells, in different stages of maturation, in IL-12p40 production *in vivo* in draining lymph nodes of BALB/c mice after 48 h of infection with *L. (L.) major*. Our results showed that CD31⁺ cells (mononuclear phagocytes precursors) were absent in the draining lymph nodes of the subcutaneously footpad injection and that the number of ER-MP58⁺ cells (immature mononuclear phagocytes), ER-HR3⁺ cells (mononuclear phagocytes in the intermediate stage of maturation) and 33D1⁺ (mature phagocytes) increases in the period of 48 h after infection. We showed, also, that ER-MP58⁺ cells were the main responsible for great part of the draining lymph nodes IL-12 production 48 h after infection with stationary-phase promastigotes of *L. (L.) major* in mice BALB/c. We suggested that, *in vivo*, the ER-MP58⁺ population, together with other cellular populations, known as IL-12 producers, has an important role in the inflammation induced by the parasitic inoculum.

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE PACIENTES CHAGÁSICOS APÓS ESTÍMULO *IN VITRO* COM ANTÍGENOS RECOMBINANTES CRA E FRA DE *Trypanosoma cruzi*¹

Virginia Maria Barros de Lorena

Diversos estudos têm demonstrado que as diferentes manifestações clínicas da doença de Chagas humana estão associadas às distintas e complexas relações parasito-hospedeiro que envolvem diretamente o sistema imune. Nesse contexto, nos propusemos a analisar a relação entre a resposta imune celular de pacientes chagásicos, após estímulo *in vitro* de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com os antígenos recombinantes CRA (*Cytoplasmatic Repetitive Antigen*) ou FRA (*Flagellar Repetitive Antigen*) de *Trypanosoma cruzi*, e as formas clínicas crônicas da doença de Chagas. O grupo de pacientes chagásicos consistiu de 36 indivíduos que foram selecionados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco e submetidos a uma triagem padronizada que incluiu: exame físico, sorologia para a infecção pelo *T. cruzi*, eletrocardiograma e raios-X de tórax e de esôfago. Dezesete portadores da forma cardíaca (FC) e 19 da forma indeterminada (FI) participaram deste estudo. Um grupo de 19 indivíduos não infectados (NC) foi incluído como grupo controle. PBMC foram isoladas por centrifugação através de um gradiente de densidade de Ficoll-Paque. As células foram estimuladas com Fitohemaglutinina, Concanavalina, CRA, FRA ou com antígeno solúvel de Epimastigota (Ag-Epi) por 24 horas, 72 horas ou 6 dias. Culturas sem estímulo foram utilizadas como controles negativos. A proliferação celular foi avaliada após estímulo por seis dias de cultivo através da quantificação de ³H-timidina incorporada. As citocinas foram detectadas em sobrenadantes de cultura obtidos após 24 horas (TNF- α e IL-4), 72h (IL-10) e 6 dias (IFN- γ) por meio de ELISA de captura. Os resultados mostraram que, apesar de apresentarem índices de estimulação baixos, as células dos pacientes chagásicos estimuladas com os antígenos recombinantes apresentaram maiores respostas proliferativas quando comparadas com as dos indivíduos NC. Não foi possível, porém, estabelecer um padrão de resposta linfoproliferativa entre os pacientes portadores das formas clínicas FC e FI da doença. Com relação às citocinas secretadas no sobrenadante de cultura após estímulo com antígenos de *T. cruzi*, os resultados mostraram que CRA, bem como Ag-Epi, foram capazes de estimular a produção de TNF- α e IFN- γ em pacientes chagásicos quando comparados com os indivíduos NC. Porém, os níveis dessas citocinas mostraram-se similares entre os pacientes chagásicos portadores das formas clínicas FC e FI. Apesar de não apresentarem a capacidade de diferenciar as formas clínicas da doença de Chagas através do ensaio de linfoproliferação e da detecção de

1 Resumo de dissertação apresentada ao Departamento de Saúde Coletiva-NESC do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ, sob a orientação da Prof^a. Dra. Yara de Miranda Gomes e da Prof^a. Dra. Valéria Rego Alves Pereira do CPqAM/FIOCRUZ, para obtenção do Título de Mestre em Saúde Pública. Recife, PE, Brasil, 2006.

Endereço para correspondência: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Departamento de Imunologia, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária.CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco.

citocinas de sobrenadante de cultura, os antígenos poderiam ser utilizados em estudos sobre a imunopatogênese da doença, investigando papéis imunorregulatórios antígeno-específicos. Além disso, esses antígenos poderiam dar continuidade ao desenvolvimento de marcadores de evolução de prognóstico das formas clínicas severas da doença de Chagas através da avaliação de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo.

EVALUATION OF IMMUNE CELLULAR RESPONSE FROM CHAGASIC PATIENTS AFTER STIMULATION *IN VITRO* WITH CRA AND FRA RECOMBINANT ANTIGENS OF *Trypanosoma cruzi*

Several studies have demonstrated that different clinical manifestations of human Chagas disease are associated with distinct and complex host-parasite relationships directly involving the immune system. In this context, we propose to analyze the relation between the cellular immune response of Chagas patients, after stimulation *in vitro* of PBMC (peripheral blood mononuclear cells) with the recombinant antigens CRA (Cytoplasmatic Repetitive Antigen) or FRA (Flagellar Repetitive Antigen) of *Trypanosoma cruzi*, and the chronic clinical forms of Chagas disease. The group of patients with Chagas' disease, 36 individuals in total, were selected at the Chagas disease clinic at the University of Pernambuco's Oswaldo Cruz Hospital and submitted to a standard screening protocol that included physical examination, serological test for *T. cruzi* infection, electrocardiogram, chest and esophagus X-ray. Seventeen patients with the cardiac form (CF) and 19 with the indeterminate form (IF) participated in this study. One group of 19 healthy individuals was included as a control group. The PBMC were isolated by centrifugation using the Ficoll-Paque density gradient. The cells were stimulated using Phytohemagglutinin, Concanavalin, CRA, FRA or a soluble antigen of Epimastigotes (Ag-Epi) for 24h, 72h or 6 days. Cultures not submitted to stimulation were used as negative controls. The proliferation of cells was evaluated after 6 days of culture by quantification of incorporated ³H-thymidine. Cytokines were measured in the supernatants obtained after 24h (TNF- α e IL-4), 72h (IL-10) and 6 days (IFN- γ) using ELISA. The results showed that, although the index of stimulation was small, the cells of the Chagas patients stimulated with the recombinant antigens exhibited higher proliferation responses compared with that of NC individuals. However, when proliferation was compared between patients with the CF or IF of the disease, it was not possible to establish a difference in the response. In relation to the cytokines secreted in the supernatants culture after stimulation *in vitro* with *T. cruzi* antigens the results showed that CRA, as well as Ag-Epi, were able to stimulate the production of TNF- α and IFN- γ in Chagas patients compared with NI individuals. However, the cytokine levels after stimulation with the *T. cruzi* antigens were not different between the patients with CF and IF. Although they do not show the ability to differentiate the clinical forms of Chagas' disease using cellular proliferation and detection of cytokines in culture supernatants, the recombinant antigens could be used in studies of the pathology of the Chagas' disease, investigating possible mechanisms that regulate parasite-specific lymphocyte responses. Moreover, these antigens could be used in further studies that aim to discover prognostic markers of the evolution of severe clinical forms of Chagas' disease by evaluating intracytoplasmic cytokines using flow cytometry.

PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi* ENTRE DOADORES DE SANGUE DO RIO GRANDE DO SUL, DE 1975 A 1996

Rita Maria Callegari Basso

Objetivo. A prevalência da infecção chagásica na população rural do Rio Grande do Sul era de 8,8% por ocasião do inquérito sorológico de 1975-1980. Após o Programa de Controle Vetorial, na população de 7 a 14 anos, as taxas reduziram-se de 5,0% (1975-1980) a 0,6% (1994-1996). Com o objetivo de verificar se a redução ocorrida na população geral também aconteceu na população de doadores de sangue, avaliaram-se os resultados obtidos na triagem sorológica de serviços de hemoterapia disponíveis no Setor de Controle de Qualidade do Sangue da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente do Estado. *Material e Métodos.* Foi estimada a prevalência da infecção por *T. cruzi* ano a ano, na população de doadores de sangue, e determinou-se a relação entre idade e ano de doação entre os hemodoadores no estado do Rio Grande do Sul, particularmente nos municípios de Santa Maria, Pelotas, Alegrete, Porto Alegre e Caxias do Sul, no período de 1975 a 1996. *Resultados.* A prevalência da infecção por *T. cruzi* entre os 1.511.935 doadores do estado foi de 0,9%. Nos municípios de Santa Maria, Pelotas, Alegrete, Porto Alegre e Caxias do Sul, foi, respectivamente, de 2,9%, 1,4%, 1,2%, 0,6% e 0,1%. Foi encontrada uma relação estatisticamente significativa entre o ano e a idade de doação nos doadores soropositivos para a infecção chagásica, no Rio Grande do Sul, observando-se um aumento médio de 5 meses por ano na idade dos doadores ($b=0,39 \pm 0,10$; $p<0,001$). *Conclusões.* A redução da prevalência da infecção chagásica, observada na população geral, refletiu-se na população de doadores de sangue do estado do Rio Grande do Sul. As prevalências observadas e o aumento da idade média anual dos hemodoadores apontam para uma possível interrupção da transmissão vetorial, associada ao sucesso do Programa de Controle do *Triatoma infestans*.

PREVALENCE OF *Trypanosoma cruzi* INFECTION AMONG BLOOD DONORS OF RIO GRANDE DO SUL, FROM 1975 TO 1996

Objective. The prevalence rate of Chagas disease among inhabitants of the rural area in Rio Grande do Sul, as related by the serological research of 1975-1980, was of 8.8%. After the Vectors Control Program, the rates were reduced from 5.0 %

1 Resumo de dissertação apresentada na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profª. Neusa Nakao Sato da Faculdade de Saúde Pública, USP, para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública – área de concentração: Epidemiologia. São Paulo, SP, Brasil, 1999.

Endereço para correspondência: Rita M. Callegari Basso. Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Caxias do Sul, rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. CEP: 95070-560, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: ritacallegari@terra.com.br

(1975-1980) to 0.6 % (1994-1996) among people between the ages of seven and 14 years old. Aiming at verifying if such a reduction in the general population was also verifiable in blood donors, results obtained from the serological screening in blood bank, services available in the Blood Quality Control Sector of the Health and Environment Secretary of the State were evaluated. *Material and Methods.* The seroprevalence of the infection by *T. cruzi* was estimated yearly in the population of blood donors, and the relationship between age and year of donation was determined among donors in the state of Rio Grande do Sul, mainly in the cities of Santa Maria, Pelotas, Alegrete, Porto Alegre and Caxias do Sul, between 1975 and 1996. *Results.* The prevalence rate of infection by *T. cruzi* among the 1,511,935 blood donors in the State was of 0.9%. In Santa Maria, Pelotas, Alegrete, Porto Alegre and Caxias do Sul, the rate was of 2.9%, 1.4%, 1.2%, 0.6% and 0.1%. A significant relationship between year and age of donation in the seropositives for Chagas disease in Rio Grande do Sul was observed, with an increase of 5 months per year in the age of donation ($b=0.39 \pm 0.10$, $p<0.001$). *Conclusions.* The reduction of the rate of prevalence of Chagas disease, observed in the general population, was reflected in the population of blood donors in the state of Rio Grande do Sul. The observed prevalence rates and the increase in the yearly average age of blood donors indicate a possible interruption in the vectorial transmission, associated with the success of the *Triatoma infestans* Control Program.