

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Infecção de células fagocíticas não-profissionais
epiteliais pelo *Trypanosoma cruzi* mediada através da
ativação de NF- κ B induzida pelo fator de necrose tumoral
(TNF)**

Doutoranda: Andrea Moraes Torres Pinto

**Orientadora: Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva
Co-Orientador: Prof. Aristóbolo Mendes da Silva**

**2011
Belo Horizonte**

**Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Infecção de células fagocíticas não-profissionais
epiteliais pelo *Trypanosoma cruzi* mediada através da
ativação de NF- κ B induzida pelo fator de necrose tumoral
(TNF)**

**Tese submetida ao
programa de pós-graduação em Biologia Celular
como requisito para obtenção do título
de Doutora em Biologia Celular**

Doutoranda: Andrea Moraes Torres Pinto

**Orientadora: Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva
Co-Orientador: Prof. Aristóbolo Mendes da Silva**

**2011
Belo Horizonte**

Tese realizada no Laboratório Profa. Conceição Machado do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva e co-orientação do Prof. Aristóbolo Mendes da Silva, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Vacinas (INCTV).

À minha inspiração, meu orgulho, meu exemplo, minha força e minha eterna saudade: Profa. Conceição Machado. Você esteve em cada etapa dessa caminhada, em cada experimento realizado, em cada nova conquista, em cada momento difícil. Seus ensinamentos me acompanharão pro resto da vida.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Elizabeth Ribeiro da Silva, minha orientadora e amiga há vários anos, quem me ensinou a dar os primeiros passos na ciência, formando minha personalidade científica e me apoiando na minha carreira e fora dela. Muito obrigada por tudo.

Ao Prof., Aristóbolo Mendes da Silva, meu co-orientador mais que orientador. Não tenho palavras para expressar meu agradecimento a você Ari, por ter me resgatado quando eu mais precisava me dando uma nova chance e me orientado nesse projeto tão bonito. Te admiro muito.

À Prof^ª Patrícia Massara Martinelli pela atenção, dedicação e presença constantes.

À Prof^ª Luciana Andrade pelas importantes contribuições no artigo e nos assuntos relacionados à cultura celular.

À Prof^ª Leonor Guerra do Laboratório de Neurobiologia pela agradável convivência e disponibilidade.

Às novas Prof^ªs do laboratório Débora D'Ávila Reis Reis, Paula Luciana Scalzo e Camila Megale de Almeida Leite, que vocês tragam nova energia e sucesso para o laboratório.

Aos professores do Departamento de Morfologia.

À ex-secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular, Sibebe Abreu

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular.

Ao meu querido ex-aluno de iniciação científica Matheus Mattos, sem você nada disso seria possível.

Aos amigos do laboratório, em especial Luciana Hoffert, Bárbara Hissa, Fábio Braga, Lucas Kraemer, Jaqueline Garcia, Ludmila Kelles.

Aos antigos alunos do laboratório Profa. Conceição Machado, Cecília Marques, Hugo Rezende, Letícia Alberti.

Aos amigos do laboratório de genes inflamatórios Filipe Leão, Kátia Maciel, Solange Gentz, Paula Sales, Carolina Damas e Thalita Marcolan

À minha família, Pai, mãe, Pe, Dani, avós e tios, companheira em todos os momentos. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais.

As queridas cunhadinhas, que fazem parte da família buscapé: Camila e Vera.

Ao professor Mauro Martins Teixeira pela doação da droga Infiximab.

A pesquisadora Catherine Ropert do Centro de Pesquisa René Rachou pela cessão dos isolados de *Trypanosoma cruzi*.

Ao professor Egler Chiari pelo fornecimento dos isolados de *Trypanosoma cruzi* e ao seu técnico Afonso.

Ao professor Ulisses Gazos Lopes (IBCCF, UFRJ) pelo gentil fornecimento dos plasmídeos DN para I κ B α .

Ao querido Xú (pros outros Polidoro ou Rafael), pelos momentos de fim de semana, pelas discussões produtivas, pelas festas nos congressos, pela amizade verdadeira.

A querida amiga e antiga companheira de laboratório Patrícia Nagib, seu marido Rafael Loyola e meu delcinha Miguel por fazerem da minha vida mais feliz.

As minhas amigas de infância Lari, Pri, Mari e Fabi, por **Tudo** e hoje em dia pelos acréscimos gerados: Camilinha, Arthur e.....

As minhas queridas irmãs de coração Lu e Carol (meus Pedro e Daniel) irmãs caçulas que a vida me deu e que amo demais.

Aos meus queridos amigos de Ouro Preto Felipe, Diva, Filó, Santana e Paty por alegrarem meu caminho.

A minha eterna turma de biologia 99-2 e as sinceras amizades que herdei dessa época: Ludmila Borges, Ana Carolina Aguiar, Eder Zucconi, Ana Carolina Neves, Flávia Gama, Priscila Viana e Valentina.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	10
Lista de figuras	14
Resumo	15
Abstract	16
1. Introdução	17
2. Objetivos	30
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Metodologia	32
3.1.Parasitos.....	33
3.2. Linhagens celulares.....	33
3.3..Preparação de plasmídeos em larga escala.....	34
3.4. Transfecção de células HEK293T.....	35
3.5. Contagem de Parasitos.....	36
3.6. Tratamento dom TNF e infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i>	37
3.7. Ensaio de viabilidade celular.....	38
3.8. Inibição da ativação de NF- κ B pelo tratamento com TPCK ou expressão do mutante dominante negativo de I κ B α	39
3.9. Infecção de células THP-1 humanas e coleta de sobrenadante.....	40
3.10. Ensaio de adesão de parasitas às células.....	
3.11. Análise estatística.....	44
4. Resultados	45

4.1. Efeito do tratamento de células HEK293T e LLC-MK2 com TNF sobre a taxa de infecção com cepa Y de <i>T. cruzi</i>	46
4.2. Efeito do tratamento com TNF sobre a taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 com cepa Y de <i>T. cruzi</i> ao longo de 24 horas.....	49
4.3. Ensaio de Viabilidade de células epiteliais após tratamento com TNF.....	52
4.4. Efeito da inibição de NF- κ B sobre a taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 estimuladas por TNF.....	53
4.5. Efeito do sobrenadante de células THP-1 sobre a taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 infectadas com cepa Y de <i>T. cruzi</i>	60
4.6. Efeito do TNF da adesão de tripomastigotas da cepa Y na superfície de células HEK293T e LLC-MK2.....	67
5. Discussão.....	69
6. Conclusões.....	78
7. Referências bibliográficas.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Proteína ativadora 1
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cIAP1	Inibidor celular da apoptose
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTRL	Controle
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DISC	Complexo indutor do sinal de morte
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DM	Domínio de Morte
DN	Dominante negativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK1-2	Cinases reguladas por sinal extracelular 1-2
FADD	Proteína associada ao domínio de morte
FIG	Figura
gp	Glicoproteína
GPI	Glicosilfosfatilinositol
H ⁺	Íon Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HEK293T	linhagem celular embrionária de rim humano
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Formatado: Português (Brasil)

H ₂ O	Água
HRP	Horseradish peroxidase
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
I κ B	Proteína inibitória de κ B
IKK	Cinase de I κ B
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-1R	Receptor de Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IRAK-1L	Cinase associada ao receptor de IL-1
IP ₃	Fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato
JNK1-2	c-Jun NH2-terminal Kinase1/2
LB	Luria-Bertoni
LLC-MK2	Linhagem de célula epitelial de rim de macaco
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKKK	Proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno
MEKK1	Cinase 1 de MAPK
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Mg ₂ SO ₄	Sulfato de magnésio
μ g	Microgramas
μ m	Micrômetro
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
μ M	Micromolar

mM	Milimolar
min	Minuto
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MyD88	Proteína adaptadora do Myeloid differentiation primary response gene
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula natural “killer”
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NOS2	Enzima óxido nítrico sintase do tipo 2
NOSi	Enzima óxido nítrico sintase induzida
p38MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno de p38
pp38	p38 fosforilada
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PBS	Tampão salina fosfato
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldeído
pg	Picograma
PI-3K	Fosfatidilinositol 3 kinase
PiP3	Fosfatidil-3-fosfato
PLC	Fosfolipase C
PMA	Parabol 12-Miristato 13-acetato
PPR	Receptor de reconhecimento de padrão
P/S	Penicilina/estreptomicina

PTK	Proteína tirosina kinase
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SD	Desvio padrão
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida para eletroforese com dodecil sulfato de sódio
SODD	Proteína silenciadora do domínio de morte
RiP1	Proteína de interação ao receptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TG	Tapsigargina
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
THP-1	Human acute monocytic leukemia cell line
TIR	Toll/receptor interleucina 1
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral tipo 1
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral tipo 2
TPCK	N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone
TRADD	Proteína do DM associada ao receptor de TNF
TRAF-2	Fator 2 associado ao receptor de TNF
TRAF-6	Fator 6 associado ao receptor de TNF
TS	Trans-sialidase
VCAM-1	Molécula de adesão vascular celular 1
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Ativação de cascatas de sinalização associadas a Ca ²⁺ por diferentes isolados de <i>T. cruzi</i> no processo de invasão de célula hospedeira	21
FIGURA 2	Vias de Sinalização de NF-κB	24
FIGURA 3	Taxa de infecção em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas por 6 horas com 20ng/ml de TNF	47
FIGURA 4	Fotomicrografia de células LLC-MK2 tratadas ou não por 6 horas com 20ng/ml de TNF	48
FIGURA 5	Porcentagem de células HEK293T e LLC-MK2 infectadas com cepa Y de <i>T. cruzi</i> e tratadas com TNF	48
FIGURA 6	Taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 estimuladas por diferentes concentrações de TNF	49
FIGURA 7	Porcentagem de células HEK293T e LLC-MK2 infectadas após estímulo com diferentes concentrações de TNF	49
FIGURA 8	Taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 tratadas com 20 ng/ml de TNF por 6 horas após diferentes períodos de infecção.	51
FIGURA 9	Taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 tratadas com Tapsigargina	52
FIGURA 10	Ensaio de viabilidade, por MTT, em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas por 6 horas com diferentes concentrações de TNF	54
FIGURA 11	Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de TPCK	56
FIGURA 12	Porcentagem de células HEK293T e LLC-MK2 infectadas. As células foram tratadas com diferentes concentrações de TPCK	57
FIGURA 13	Mecanismo de ativação de NF-κB dependente da fosforilação de IκB.	58
FIGURA 14	Efeito do dominante negativo (DN) de IκBα na ativação de NF-κB induzida por tratamento com TNF em células HEK293T	58
FIGURA 15	Taxa de infecção de células HEK293T transfectadas, ou não, com 3 concentrações(1, 2 ou 4μg) de plasmídeos pCDNA3, ou DN IκBα e posteriormente tratadas com TNF	60
FIGURA 16	de parasitos intracelulares em diferentes tempos após infecção de células THP-1	61
FIGURA 17	Ativação de NF-κB pelo sobrenadante de células THP-1 infectadas com cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> por 2 e 24 horas.	62
FIGURA 18	Análise, por western blot, da fosforilação de p38 MAPK em células THP-1 após infecção em diferentes intervalos de tempo	63
FIGURA 19	Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas por 6 horas com meio condicionado por células THP1	64
FIGURA 20	Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 crescidas na parte inferior do transwell	65
FIGURA 21	Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas ou não com anticorpo anti-TNF (infiximab)	67
FIGURA 22	Número de tripomastigotas da cepa Y de <i>Trypanosoma cruzi</i> aderidos à superfície das células HEK293T e LLC-MK2 após tratamento ou não com 20ng/ml TNF	68
FIGURA 23	Fotomicrografia representando tripomastigotas aderidos à superfície de células LLC-MK2 tratadas ou não com 20ng/ml de TNF	69

Resumo

Na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* ocorre produção local de citocinas pro-inflamatórias, principalmente por células da linhagem macrofágica parasitadas. Essas citocinas podem atuar em células fagocíticas não profissionais, como fibroblastos e células epiteliais, que estão nesse ambiente pro-inflamatório e que serão posteriormente infectadas pelo parasito. Entretanto, o efeito desse ambiente inflamatório na invasão dessas células ainda não foi completamente elucidado. Nesse trabalho nós demonstramos que duas linhagens epiteliais, HEK293T e LLC-MK2, tornam-se mais susceptíveis a infecção pela cepa Y de *T. cruzi* após tratamento com TNF. O aumento na invasão está relacionado com a concentração de TNF. Esses tipos celulares também apresentam maior número de parasitos intracelulares quando tratadas com sobrenadante de células THP-1 previamente à infecção com *T. cruzi*, e esse efeito é inibido por inativação do sobrenadante com anticorpo monoclonal para TNF. Além disso, nossos resultados mostram que a maior susceptibilidade à infecção induzida por TNF é revertida por tratamento prévio com TPCK, inibidor de NF- κ B.

Nossos dados indicam que fatores solúveis liberados por células imunes infectadas por *T. cruzi* favorecem a invasão de células epiteliais por este parasito.

Abstract

At the site of infection, pro-inflammatory cytokines locally produced by macrophages infected with *Trypanosoma cruzi* can activate surrounding non-professional phagocytes such as fibroblasts, epithelial and endothelial cells, which can be further invaded by the parasite. The effect of secreted soluble factors on the invasion of these cells remains, however, to be established. We show here that two epithelial cell lines become significantly susceptible to the infection by the Y strain of *T. cruzi* after tumor necrosis factor (TNF) treatment. The increase in the invasion was correlated with the increasing concentration of recombinant TNF added to cultures of HEK293T or LLC-MK2 cells. Supernatants taken from PMA-differentiated human monocytes infected with *T. cruzi* also increased the permissiveness of epithelial cells to subsequent infection with the parasite, which was inhibited by a TNF monoclonal antibody. Furthermore, the permissiveness induced by TNF was inhibited by TPCK, and led to significant decrease in the number of intracellular parasites, providing evidence that activation of NF- κ B induced by TNF favors the invasion of the epithelial cell lines by *T. cruzi* through yet an unidentified mechanism. Our data indicate that soluble factors released from macrophages early in the infection favors *T. cruzi* invasion of non-professional phagocytic cells.

Introdução

1 Introdução e Justificativa

A doença de Chagas é uma zoonose que acomete entre 8-15 milhões de pessoas na América Latina; estima-se que cerca de 40 milhões estão sob risco de infecção natural por insetos triatomíneos da família Reduviidae (revisito em Lannes-Vieira *et al.*, 2010). A transmissão congênita compreende cerca de 14.000 casos por ano. A mortalidade deve-se, principalmente, à falência cardíaca congestiva e estima-se que atualmente 1,8 milhões de pessoas tenham desenvolvido cardiomiopatia chagásica congestiva (Coura & Dias, 2009; Moncayo & Silveira, 2009). A realização de programas de controle epidemiológico conduzidos pelo Brasil, Uruguai e Chile permitiu a redução significativa da transmissão natural dessa infecção, o que resultou em certificação, pela WHO, em 2000, por controle do vetor *Triatoma infestans*.

Outras vias de transmissão da doença de Chagas são a transfusão sanguínea e os acidentes laboratoriais. A transmissão por transfusão sanguínea passou a ser relevante devido à imigração da zona rural para as áreas urbanas, entre 1970 e 1980. Na maioria dos países da América Latina, o exame para a detecção da doença de Chagas está incorporado aos testes realizados em bancos de sangue (Moncayo & Silveira, 2009). Esta forma de transmissão constitui problema de saúde pública no Canadá, México, Estados Unidos da América e Japão, devido à constante imigração de cidadãos latinos (Coura, 2010).

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas bem caracterizadas, a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda observam-se tripomastigotas na

corrente sanguínea e ninhos de amastigotas em diferentes tipos celulares, mas principalmente em células musculares.

Os tripomastigotas se multiplicam sob a forma de amastigotas no citoplasma das células hospedeiras e, após diferenciação para a forma infectante, são liberados pelo rompimento da célula parasitada (Brener, 1973; Carvalho & De Souza, 1989; Souza, 2000). Nesta fase, evidencia-se resposta imune inflamatória local e sistêmica. A grande maioria, 99%, dos pacientes é assintomática na fase aguda, ou manifesta uma leve febre e linfadenopatia. Entretanto, em crianças e idosos, os sintomas podem ser mais graves e se não tratadas podem levar a óbito em 5-10% dos casos (WHO, 2002). As principais alterações patológicas no coração são a miocardite, a congestão, o edema, o infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e o aumento das câmaras cardíacas (Prata, 1994).

Na fase crônica ocorre diminuição drástica no número de parasitos circulantes no sangue e de ninhos de amastigotas nos tecidos. Descrevem-se três formas clínicas distintas: a indeterminada (assintomática), a cardíaca (cardiomiopatia chagásica) e a digestiva (megacólon e/ou megaesôfago). A forma digestiva é encontrada quase exclusivamente na parte sul da bacia amazônica. Essa distribuição geográfica parece estar relacionada com o isolado, ou população, do parasito (Campbell, *et al.*, 2004). A forma cardíaca é a mais grave e frequente entre as formas sintomáticas da doença, acometendo entre 20-30% dos pacientes. Os pacientes geralmente vêm a óbito devido à falência cardíaca congestiva (Rassi, *et al.*, 2000). A forma assintomática acomete 70% dos pacientes chagásicos crônicos, que embora apresentem positividade para

anticorpos contra o *T. cruzi*, não manifestam sintomas de cardiomiopatia ou distúrbios digestivos (Tanowitz *et al.*, 1992; Prata, 2001).

Ainda não se sabe quais fatores determinam a evolução das formas clínicas da doença de Chagas. Admite-se que tanto diferenças na resposta do hospedeiro à infecção, quanto à heterogeneidade genômica do *T. cruzi* estejam envolvidas neste processo (Macedo & Pena, 1998). Em relação ao hospedeiro, o perfil da resposta imune ao *T. cruzi*, assim como seu papel no desenvolvimento da infecção tem sido objeto de estudo intenso (revisto em Kayama & Takeda, 2010).

O *T. cruzi* pode utilizar diferentes mecanismos de invasão relacionados com o perfil de receptores e ligantes disponíveis na superfície da célula-alvo. O processo de invasão inicia-se com a adesão do parasito à superfície celular. O grau de adesão depende do isolado, da forma evolutiva do parasito e do tipo celular parasitado (Araújo-Jorge, *et al.*, 1992).

Tripomastigotas são capazes de invadir fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, fibroblastos, macrófagos, células gliais e epiteliais (Andrade, 2000). A entrada desse parasito em células não fagocíticas epiteliais depende de sinalização de cálcio mediada por proteína G (Tardieux *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1998). A adesão do parasito ativa fosfolipase C (PLC) e libera cálcio de estoques intracelulares sensíveis a trifosfato de inositol (IP3) (Rodrigues *et al.*, 1995). A capacidade de os tripomastigotas, de diferentes isolados de *T. cruzi*, invadirem as células hospedeiras também está relacionada à expressão diferencial de glicoproteínas presentes na superfície do parasito. Essas moléculas exibem atividade específica sinalizadora de cálcio nas células hospedeiras (Ruiz, *et al.*, 1998). A análise de moléculas de superfície desse parasito possibilitou sua divisão em dois grupos distintos quanto à capacidade de invasão, *in vitro*, de

células de mamíferos (Yoshida, 2006). Tripomastigotas de isolados mais infectantes, como o clone CL-Brener, ligam-se à superfície da célula hospedeira através de gp82 e induzem a ativação de PTK (proteína tirosina kinase). Essa sinalização também envolve a ativação da fosfolipase (PLC), a geração de IP3 (fosfatidilinositol 1,4,5 trifosfato) e, conseqüentemente, a mobilização de Ca^{2+} dos seus estoques intracelulares do retículo endoplasmático. Essas populações de maior capacidade infectante não possuem as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50.

Por outro lado, em isolados de menor capacidade infectante, como a cepa G, a ligação à superfície celular ocorre principalmente através de gp35/50, que promove cascata de sinalização menos eficiente. Nesses isolados, a cascata independe de PTK e de PLC e, provavelmente, é dependente de AMPc (AMP cíclico). Neste caso, o Ca^{2+} necessário para o processo de invasão parece ser liberado para o citosol a partir de vacúolos com sistema de troca iônica Ca^{2+}/H^+ , também chamados acidocalcisomas. A Figura 1 mostra a interação dos dois grupos de glicoproteínas com a superfície da célula hospedeira.

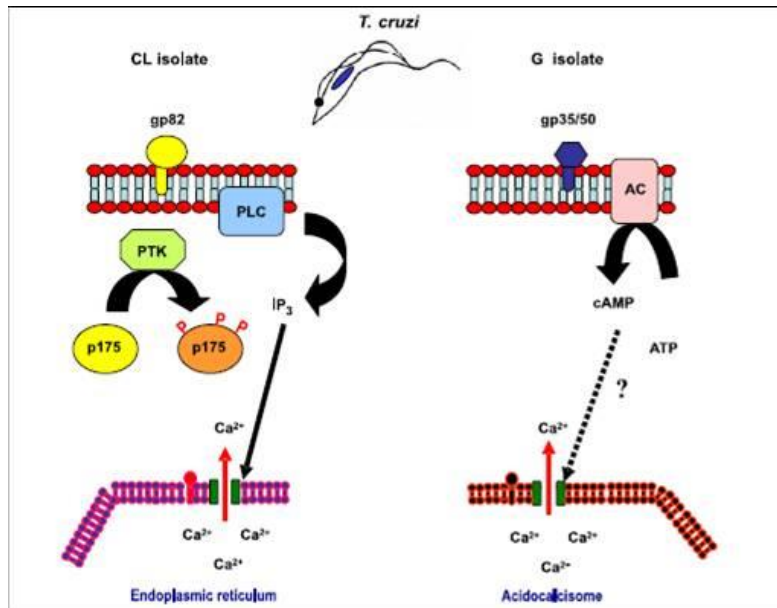


Figura. 1: Ativação de cascatas de sinalização associadas a Ca²⁺ por diferentes isolados de *T. cruzi* no processo de invasão de célula hospedeira (retirado de Yoshida, 2006)

Segundo Andrews (1995) a elevação dos níveis intracelulares de cálcio na célula hospedeira promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito seguido por sua fusão com a membrana e formação do vacúolo parasitóforo. Os lisossomos são deslocados por uma proteína motora associada aos microtúbulos, a cinesina (Tardieux, *et al.*, 1992; Rodríguez, *et al.*, 1996). Ademais, o processo de invasão é facilitado pela ruptura de microfilamentos de actina (Tardieux, *et al.*, 1992).

A proteína sinaptotagmina VII, membro da família sinaptotagmina e presente na superfície de lisossomos de diferentes tipos celulares, participa da regulação desse processo mediante domínio de ligação ao Ca²⁺ (Caler *et al.*, 2001; Yoshida, 2006).

Burleigh (2005) preconiza outra via de entrada para o parasito, independente da fusão de lisossoma com a membrana plasmática. Por esta visão, o *T. cruzi* entraria na célula hospedeira através de invaginações da membrana plasmática com acúmulo de PIP3 (fosfoinositol-3-fosfato), produto da ativação da PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase). Essa autora descreve que, logo após a invasão da célula, 20% dos parasitos estão colocalizados com os lisossomos, 50% em vacúolos contendo marcadores de membranas e 20% em endossomos primários. Desse modo, a fusão com os lisossomos não seria fundamental para o processo de internalização do parasito. Entretanto, 60 minutos após a entrada, 100% dos parasitos estão colocalizados com os lisossomos, o que poderia indicar a fusão com lisossomos como processo fundamental para o estabelecimento da infecção, mas não para o processo de invasão.

RESPOSTA IMUNE INATA: ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF- κ B

Um aspecto importante da infecção por patógenos refere-se à ativação de componentes celulares que medeiam a cascata de sinalização do fator de transcrição NF- κ B. A família dos fatores de transcrição NF- κ B regula a expressão de genes que participam do controle da resposta imune inata e adquirida (Karin & Delhase, 2000), tais como os que codificam citocinas, moléculas de adesão e moléculas co-estimulatórias que medeiam a interação célula-célula e regulam as funções imune celulares.

O NF- κ B é um fator de transcrição formado por um grupo de cinco proteínas que podem formar complexos homo ou heterodiméricos: p50 (NF- κ B1),

p52 (NF- κ B2), p65/RelA, c-Rel e Rel. Na ausência de estímulos, o NF- κ B está presente no citosol sob a forma inativa, associado a proteínas inibitórias da família I κ B, que englobam as proteínas I κ B α (alfa), I κ B β (beta), I κ B γ (gama), I κ B ϵ (epsilon), Bcl-3, p100 e p105. Após estímulo apropriado, I κ B-alfa é fosforilada nos resíduos de Ser32 e Ser36 pelo complexo multiprotéico constituído de duas subunidades catalíticas, a IKK-alfa e IKK-beta, e uma subunidade regulatória não-catalítica, a IKK-gama. Em seguida, I κ B-alfa é rapidamente degradada pelo proteassomo 26S, permitindo que o NF- κ B agora livre possa se translocar para o núcleo, onde então se liga a elementos regulatórios específicos presentes na região promotora de genes pró-inflamatórios (Hayden & Ghosh 2004; Perkins, 2007).

Vários estímulos extracelulares podem induzir a ativação de NF- κ B (FIG. 2) como, por exemplo, moléculas de patógenos que são reconhecidas pelos receptores tipo Toll (TLR), um componente celular chave na infecção de macrófagos pelo *T. cruzi*.

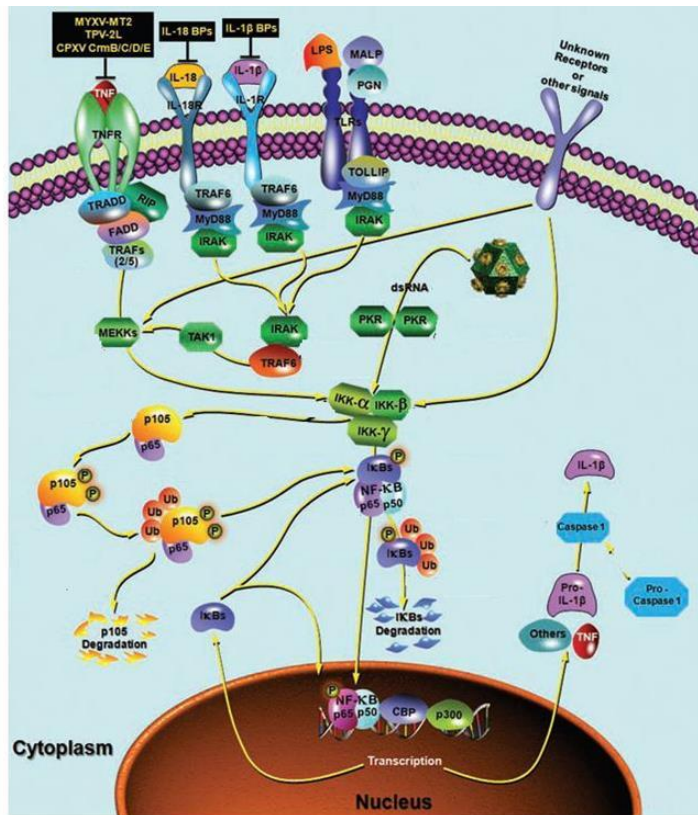


Figura 2: Vias de sinalização de NF-κB (Mohamed *et al*, 2009, modificado)

Esses receptores são expressos em células da resposta imune inata como os macrófagos e células dendríticas e são críticos para o recrutamento de fagócitos para o tecido infectado, desenvolvimento de imunidade adquirida protetora e eliminação do patógeno invasor. De fato, os TLRs estão envolvidos na defesa contra todas as categorias de microrganismos causadores de doenças, incluindo os protozoários parasitos (Campos, *et al.*, 2001; Li, *et al.*, 2010; Oliveira, *et al.*, 2010).

Os TLRs são receptores transmembrana do tipo 1, formados por uma porção extracelular rica em repetições de leucina e uma parte intracitoplasmática carboxi-terminal que contém uma região conservada conhecida como domínio de

homologia de receptores interleucina/Toll (TIR, do inglês *Toll/Interleukin Receptor*). O domínio extracelular é responsável pelo reconhecimento do ligante e pela dimerização do receptor (revisto em Kleijn & Pasterkamp, 2003; Banerjee & Gerondakis, 2007).

Os TLRs reconhecem estruturas macromoleculares que são características de organismos patogênicos, chamadas padrões moleculares associados à patógeno (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*) como, por exemplo, as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) derivadas de protozoários parasitos (Campos, *et al.*, 2001), o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas, o RNA de dupla-fita de vírus, sequências CpG de DNA bacteriano, flagelina, entre outros (Janeway & Medzhitov, 2002; Chaturvedi & Pierce, 2009).

Os PAMPs são especificamente e seletivamente reconhecidos pelos TLRs expressos como proteínas transmembrana nas células hospedeiras. Até o momento 11 tipos de TLRs foram descobertos nas células de mamíferos . Uma vez ativados, os TLRs desencadeiam cascatas de sinalização que levam à expressão de uma série de proteínas, incluindo as citocinas pró-inflamatórias (Barton & Medzhitov, 2003; Chaturvedi & Pierce, 2009).

De modo semelhante ao receptor de interleucina-1 (IL-1R, após a estimulação pelos seus respectivos PAMPs, os TLRs recrutam uma proteína adaptadora citoplasmática específica como, por exemplo, MyD88, e a cinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK – IL-1R-associated kinase), induzindo a ativação do fator 6 associado ao receptor do TNF (TRAF6 - TNF receptor-associated factor 6). Em seguida, o complexo IRAK-TRAF6 se dissocia do TLR e interage com a MAPKKK (“Mitogen-activated protein kinase kinase kinase”) e com a cinase de I κ B alfa, a IKK-alfa do complexo IKK, iniciando assim a ativação de

NF- κ B. Estabelece-se, assim, uma relação dinâmica entre TLRs, PAMPs e NF- κ B (Kawai & Akira, 2006; O'Neill & Bowie, 2007).

O TLR2 é responsável pelo reconhecimento das âncoras de glicosilfosfatidilinositol derivadas de *T. cruzi*, sendo sua dimerização com TLR6 ou TLR1 fundamental para sua ativação (Campos *et al.*, 2001; O'Neil, 2006). A ligação com TLR2 ativa cascata de transdução de sinal que promove a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e, conseqüentemente, a resposta celular pró-inflamatória (Campos, *et al.*, 2001 Ishii *et al.*, 2008).

A ativação de NF- κ B promove a transcrição de genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o TNF (fator de necrose tumoral), a IL-12 (Interleucina 12), IL-1 β (Interleucina 1 β), IL-6 (Interleucina 6) e da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2), responsável pela produção de óxido nítrico - NO (Chandrasekar, *et al.*, 1998).

O TNF é secretado por macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T, células natural "killers" (NK) e cardiomiócitos após diferentes estímulos incluindo Interferon-gama (IFN-gama), IL-12, bradicinina e complexos imunes (Machado, *et al.*, 2000). Por outro lado, IL-6 e TGF- β (Fator de crescimento transformante beta) são capazes de inibir a produção de TNF (Ming, *et al.*, 1995). As citocinas TNF, IL-1 β e IL-6 regulam sinergicamente sua própria produção através de mecanismos parácrinos e autócrinos (Chandrasekar, *et al.*, 1998; Cope, 1999; Aliberti, *et al.*, 2001).

O TNF possui um amplo espectro de atividades incluindo-se ação citolítica e citostática em células tumorais, aumento da fagocitose e citotoxicidade em neutrófilos, inibição de mecanismos anticoagulatórios, ação quimiotática em neutrófilos, indução de síntese de várias citocinas quimioatrativas, estimulação de

angiogênese, indução de síntese de IL-1 e fagocitose em macrófagos, estimulação de síntese de NO e síntese de IFN- γ (interferon gama) por leucócitos (Silva, *et al.*, 1995; COPE, 1999; Aliberti, *et al.*, 2001). A IL-1 é produzida por diferentes tipos celulares, como macrófagos, queratinócitos e células endoteliais e pode atuar na ativação de linfócitos, induzindo a síntese de TNF, IL-6, anticorpos, NO e na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS/NOS2). Essa citocina também induz hipertrofia de certos tipos celulares (Titus, *et al.*, 1991; Petersen & Burleigh, 2003). A produção excessiva de TNF pode agravar a patologia e levar o hospedeiro à morte (Titus, *et al.*, 1991).

O TNF atua nas células através da ligação com dois receptores o receptor de TNF do tipo 1 (TNF-R1) e o receptor de TNF do tipo 2 (TNF-R2), promovendo a ativação de cascatas de sinalização intracelular. Os receptores de TNF (TNFRs) são receptores transmembrana do tipo 1 cujo domínio extracelular possui de 1-5 repetições ricas em cisteína e o domínio intracelular um domínio de morte (DM). O TNF-R1 possui o DM em sua porção citoplasmática, enquanto o TNF-R2 não o possui. Conseqüentemente, o TNF-R1 traduz sinais tanto de sobrevivência e inflamação, mediada por NF- κ B, quanto sinais de morte celular, mediado por caspases; enquanto o TNF-R2 traduz preferencialmente sinais de sobrevivência celular (Gupta, 2001; Thommesen & Laegreid, 2005).

A ligação de TNF a ambos receptores promove a liberação da proteína silenciadora dos domínios de morte (SODD) dos seus domínios intracelulares permitindo a ligação da proteína do domínio de morte associada à TNFR (TRADD) (Takada, *et al.*, 2003). A ligação de TRADD ao domínio citoplasmático do TNFR recruta proteínas adaptadoras acessórias como RIP1 (proteína de interação ao receptor), TRAF2, e cIAP1 (inibidor celular da apoptose) que juntas formam o

complexo I. O complexo I sinaliza ativando cinases indutoras de NF- κ B e MEKK1 (MAPK cinase 1) que desencadeiam a cascata ativadora de NF- κ B, promovendo assim a transcrição de genes antiapoptóticos e pró-inflamatórios (Hayden & Gosh, 2004). De forma alternativa, a ligação do TNF ao TNFR-1 pode recrutar TRADD que, ativado, recruta outra proteína adaptadora, a proteína associada ao domínio de morte (FADD). FADD ativado promove o recrutamento de procaspase 8 para formar o complexo indutor do sinal de morte (DISC), que promove a ativação dessa caspase liberando-a no citoplasma. A liberação da caspase 8 no citosol desencadeia uma cascata de ativação de caspases, caspase 3, 6 e 7 que vão agir em diferentes substratos resultando nas características bioquímicas e morfológicas de apoptose (Irmiler, *et al.*, 1997; Kataoka, *et al.*, 1998).

As formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi* são capazes de parasitar células fagocitárias profissionais como macrófagos e não-profissionais como células epiteliais, musculares e fibroblastos. Os mecanismos moleculares que favorecem a persistência do parasito em células fagocitárias não-profissionais são ainda desconhecidos e pouco explorados.

Hall *et al* (2000) demonstraram que NF- κ B não é ativado de forma eficiente em células musculares cardíacas após infecção com *T. cruzi*, o que poderia explicar o tropismo preferencial por este tipo celular, principalmente na fase aguda da infecção.

No local da infecção como a pele, por exemplo, os fatores solúveis secretados pelos fagócitos profissionais infectados pelo *T. cruzi* se difundem no meio extracelular e agem sobre outras células vizinhas tais como os fagócitos não-profissionais que incluem fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Entretanto, ainda é obscuro como essas células, após serem ativadas por fatores

pró-inflamatórios como as citocinas, respondem à infecção pelo *T. cruzi*. Como o TNF é uma das principais citocinas secretadas por células da resposta imune inata numa infecção, decidimos investigar o número de parasitos intracelulares em células fagocíticas não-profissionais ativadas pelo tratamento com o TNF.

A ligação do TNF ao seu receptor celular pode disparar, além de outras vias intracelulares, a ativação de NF- κ B que por sua vez regula a expressão de um grande número de genes que estão implicados na resposta imune e inflamatória, na adesão e no crescimento celular.

Em vista disso, nosso estudo hipotetiza que fagócitos não-profissionais ativados pelo TNF apresentem modificações em seu padrão de expressão gênica e, conseqüentemente, protéico, que podem refletir a sua permissividade à infecção pelo *T. cruzi*.

Objetivos

2 Objetivos

Investigar qual é o efeito da ativação celular induzida por TNF sobre a invasão de células fagocíticas não profissionais pelo *T. cruzi*.

2.1. Objetivos específicos:

2.1.2 Verificar o efeito do TNF sobre o número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 infectadas com a cepa Y de *T. cruzi*.

2.1.3 Verificar o efeito da inibição da ativação de NF- κ B induzida por TNF em células HEK293T e LLC-MK2 sobre o número de parasitos intracelulares.

2.1.4 Verificar o efeito de fatores liberados por fagócitos profissionais infectados por *T. cruzi* sobre o número de parasitos intracelulares em células fagocíticas não-profissionais.

2.1.5 Verificar o efeito da neutralização de TNF em sobrenadantes obtidos de culturas de fagócitos infectados por *T. cruzi* sobre a infecção de células HEK293T e LLC-MK2.

2.1.6 Verificar o efeito da inibição do cálcio intracelular em células HEK293T e LLC-MK2 sobre o número de parasitos intracelulares.

2.1.7 Verificar a capacidade de adesão de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em células HEK293T e LLC-MK2 estimuladas com TNF.

Metodologia

3 Materiais e Métodos

3.1 Parasitos

A cepa Y de *T. cruzi* foi mantida em culturas de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2) cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – GIBCO) suplementado com 2% SFB (soro fetal bovino), 1% glutamina e 1% penicilina-streptomicina(P/S). As células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada, a 37° C e 5% de CO₂. Sobrenadante com tripomastigotas foi coletado em tubo de poliestireno, centrifugado por 10 minutos a 2.200 r.p.m., e a seguir mantidos em estufa com atmosfera úmida por, pelo menos, três horas, para separação dos tripomastigotas de amastigotas e restos celulares. A seguir, o sobrenadante foi coletado e o número de tripomastigotas viáveis foi estimado em câmara de Neubauer.

3.2 Linhagens celulares

Células LLC-MK2 e HEK293T (linhagem celular embrionária de rim humano) foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% P/S e 1% glutamina. As células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada, a 37° C e 5% de CO₂. Em todos os experimentos onde determinamos o número de parasitas intracelulares, ambos os tipos celulares foram tripsinizados com tripsina 0,5% (Invitrogen) e plaqueados em lamínulas de vidro na densidade de $1,5 \times 10^5$ (contadas em câmara de Neubauer) para que no dia da realização dos experimentos estivessem com a confluência ideal (80-90%). Estoques celulares, na concentração de 1×10^6 , foram mantidos congelados em SFB contendo 10% de DMSO (dimetilsulfóxido), em criotubos, à -70°C.

3.3 Preparação de plasmídeos em larga escala

Para a obtenção dos plasmídeos, bactérias DH5 α eram transformadas com os plasmídeos usados neste estudo, a saber: pEGFP-N1 (CLONTECH), pCDNA3.1 (Invitrogen) e pRcCMV-IkBa-DN (TRAENCKNER, *et al.*, 1995 – gentilmente cedido pelo Prof. Ulisses Gazos Lopes, IBCCF, UFRJ). A cada 100 μ l de bactéria em um tubo de microcentrífuga de 1,5ml, eram adicionados até 5 μ l de plasmídeo, gentilmente misturados e em seguida incubado em banho de gelo por 30 minutos, seguido de incubação a 37°C por 45 segundos e banho de gelo por 30 segundos. Um mililitro de meio LB sem antibiótico (a 37°C) era adicionado e a mistura incubada por 60 minutos a 37°C em shaker orbital sob agitação moderada. A suspensão era centrifugada a 8.000 x g por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenseo gentilmente em 100 μ l de meio LB sem antibiótico. A suspensão era então plaqueada em ágar LB (Luria-Bertani) contendo ampicilina 100 μ g/ml, e então incubada por 16-18 horas a 37°C. Uma colônia de cada placa era selecionada e crescida a 37°C em meio LB líquido contendo 100 μ g/ml, com agitação constante, por 12-14h. A extração dos plasmídeos era realizada seguindo-se o protocolo do kit Wizard[®] Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega). Toda amostra da cultura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 minutos (min), à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenseo em 15 ml de solução de ressuspensão de células. A solução de lise celular foi adicionada e a mistura homogeneizada por inversão. Após 20 minutos, foi adicionada a solução de neutralização, seguida de homogeneização por inversão. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 15 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo de centrífuga. Foi

adicionado metade do volume da amostra de isopropanol seguida da homogeneização por inversão. Após nova centrifugação a 14.000 x g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de DNA resuspenso em 2 ml de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Após adição de 10 ml de resina, a solução de DNA foi homogeneizada e transferida para maxicoluna aplicada a aparelho de vácuo. A coluna foi lavada e o DNA eluído com água livre de nuclease aquecida a 65°C, após centrifugação a 1300 g por 5 minutos. O DNA coletado foi transferido para um tubo de microcentrífuga e armazenado a -20°C.

3.4 Transfecção de células HEK293T

As células HEK293T foram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro, e cultivadas por 16-18 horas de modo que apresentassem 85-90% de confluência no momento da transfecção. A quantidade de plasmídeo a ser transfectada era preparada em 150 µl de meio DMEM livre de soro e antibióticos. O reagente PEI (Polyethylenimine) foi adicionado ao mix acima na proporção de 5:1, relativa para quantidade em µg de DNA plasmideano. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 300 µl de DMEM suplementado com 10% de SFB, seguido de centrifugação. O mix de transfecção foi então adicionado gota-a-gota por toda extensão do poço. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram infectadas com cepa Y de *T. cruzi* (10 parasitos por célula) por duas horas, retirando-se os parasitos em seguida. Após vinte e duas horas, as lamínulas contendo as células eram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) por 16-18 horas e então coradas com DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole – 1:1000) para

determinar a taxa de infecção dessas células, ou seja, o número de parasitos intracelulares por cada grupo de 100 células.

3.5 Contagem dos parasitos

Para a quantificação dos ensaios de infecção, as células previamente plaqueadas em lamínulas foram coradas com DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) Invitrogen, que marca o DNA genômico das células e dos parasitos, assim como o DNA mitocondrial dos cinetoplastos do *T. cruzi*. Após a marcação, foi avaliada a taxa de infecção (o número de parasitos intracelulares/número total de células) e o número de células infectadas para cada condição estudada. Esta análise foi conduzida em microscópio de fluorescência Axioplan-2 da Zeiss (objetiva de imersão com aumento de 63X). Em cada lamínula foram contados de 10-15 campos aleatórios, totalizando um número mínimo de 250 células, e os experimentos foram realizados em triplicata.

Nos experimentos fixados em períodos de tempo inferiores a 8 horas, os tripomastigotas extracelulares foram marcados por técnica imunohistoquímica para diferenciá-los dos parasitos intracelulares e, assim, permitir maior precisão na determinação do número de parasitos intracelulares. Nesses casos, os parasitos foram marcados com anticorpo primário anti-*T. cruzi* obtido em coelho (1:500) (gentilmente cedido pela Profa Luciana de Oliveira Andrade – ICB/UFMG) e, posteriormente, com anticorpo secundário IgG cabra anti-coelho conjugado com Alexa flúor 546 (1:500) (Molecular Probes). A seguir, procedeu-se à coloração com DAPI (1:1000). O número de parasitos intracelulares foi determinado pela subtração do número de parasitos extracelulares do número total de parasitos DAPI-positivos.

3.6 Tratamento com TNF e infecção com cepa Y de *T. cruzi*

Células HEK293T e LLC-MK2, na concentração de $1,5 \times 10^5$ /poço, foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 24 horas as células eram tratadas com 20 ng/ml de TNF (Fator de necrose Tumoral – Sigma) por 6 horas e posteriormente infectadas por 2 horas com cepa Y de *T. cruzi* como já descrito. Após 22 horas, as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como descrito no item 3.5.

Para estabelecimento de curva de infecção em células estimuladas ou não com TNF, as células foram plaqueadas na mesma densidade já descrita, em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 24 horas, as células foram tratadas por 6 horas com TNF e, a seguir infectadas com cepa Y de *T. cruzi* por 2 horas. As lamínulas foram coletadas 2, 4, 6, 8, 16 e 24 horas após o período de 2 horas de infecção e fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI. A taxa de infecção foi determinada como descrito no item 3.5.

Para estabelecimento da curva de dose-resposta entre a concentração de TNF utilizada para estimular as células e a taxa de infecção, células HEK293T e LLC-MK2 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e após 24 horas estimuladas por 6 horas com as seguintes concentrações de TNF: 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml e 40 ng/ml. Após o estímulo com TNF, as células foram infectadas com cepa Y de *T. cruzi* por 2 horas como já descrito. Após 24 horas de infecção, as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como descrito no item 3.5.

Para determinarmos se o cálcio intracelular estava envolvido no aumento da taxa de infecção após o tratamento das células com TNF, utilizamos o fármaco tapsigargina (Sigma-Aldrich). Células HEK293T e LLC-MK2 foram plaqueadas na mesma densidade já descrita, em placas de 24 poços contendo lamínulas. Após 24 horas, ambos os tipos celulares foram pré tratados com tapsigargina nas concentrações de 1 μ M ou 3 μ M por 30 minutos seguindo-se ou não de tratamento com TNF (20 ng/ml), por 6 horas. Um grupo de células foi tratado somente com TNF (20ng/ml) por 6 horas para comprovar a ação do TNF na taxa de infecção. Após os tratamentos as células foram lavadas com PBS e infectadas com cepa Y de *T. cruzi* por 2 horas como já descrito anteriormente. Após 24 horas, as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como descrito no item 3.5.

3.7 Ensaio de Viabilidade Celular

Para análise da viabilidade das células tratadas com TNF, em diferentes concentrações, utilizou-se o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide). Ambos os tipos celulares foram plaqueados na mesma densidade celular utilizada anteriormente, em placas de 24 poços e após 24 horas de plaqueamento, tratadas com TNF, nas concentrações de 1, 10 e 20 ng/ml, por 6 horas. Para o ensaio de MTT, foi retirado todo o meio de cultura de cada poço e adicionados 210 μ l de DMEM suplementado com 10% SFB e 170 μ l de solução de MTT (5mg/ml). As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 2 horas, foi adicionado 210 μ l de solução SDS (Dodecilsulfato de sódio) – 10% HCl e a placa foi incubada novamente por 16-18h em estufa. O meio de cultura contendo MTT foi retirado e a intensidade da cor avaliada através de

leitura de absorbância a 595 nm (Versamax™, Molecular Devices), sendo diretamente proporcional ou número de células viáveis presentes na amostra. Células viáveis são capazes de catalisar a conversão do MTT tetrazolina (amarelo) em cristais de MTT-Formazan (azul escuro) que é, então, dissolvido pela solução de SDS.

3.8 Inibição da ativação de NF-κB pelo tratamento com TPCK ou expressão do mutante dominante negativo de IκBα

Células HEK293T e LLC-MK2 foram plaqueadas na densidade celular já determinada, em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 24 horas de plaqueamento, as células eram tratadas com as concentrações crescentes de TPCK (N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone) (1, 5, 10 e 25 μM) por 30 minutos e posteriormente incubadas, ou não, por 6 horas com 20 ng/ml de TNF. Posteriormente, as células foram infectadas por 2 horas com cepa Y de *T. cruzi* como já descrito anteriormente. Após 22 horas as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como descrito no item 3.5.

Para o ensaio de transfecção, células HEK293T foram plaqueadas em placas de 24 poços (1,5 x 10⁵ células/poço), contendo lamínulas de vidro, e cultivadas por 16-18 horas de modo que apresentassem 85-90% de confluência no momento da transfecção. A quantidade de plasmídeo a ser transfectada foi preparada em 150 μl de meio DMEM sem soro. O reagente PEI (Polyethylenimine) foi adicionado ao mix acima na proporção de 5:1, relativa para quantidade em ug de DNA plasmideano. Após 10 min de incubação à temperatura

ambiente, foram adicionados 300 μ l de DMEM suplementado com 10% de SFB, seguido de centrifugação.

O mix de transfecção foi então adicionado gota-a-gota por toda extensão do poço. As células foram transfectadas de acordo com os seguintes grupos: Células não transfectadas e que recebem todos os reagentes da transfecção; células transfectadas com três concentrações distintas de plasmídeo vetor pCDNA3: 1 μ g, 2 μ g ou 4 μ g; e células transfectadas com as mesmas concentrações do plasmídeo pRcCMV-I κ B α -DN : 1 μ g, 2 μ g ou 4 μ g. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram tratadas ou não com TNF por 6 horas e posteriormente infectadas por 2 horas com cepa Y de *T. cruzi* como já descrito anteriormente. Após 2 ou 24 horas, as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como descrito no item 3.5.

3.9 Infecção de células THP-1 humanas e coleta do sobrenadante

Células THP-1 (1×10^7) em suspensão crescendo em placas de 10 cm de diâmetro contendo meio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado com 10% SFB, 1% P/S e 1% de glutamina foram diferenciadas com 100 nM de PMA (Parabol 12-Miristato 13-acetato – Sigma) por 48 horas em estufa a 37°C, 5% CO₂. As células foram infectadas (10 parasitos por célula) por 2 horas e o sobrenadante coletado e centrifugado a 3000 rpm por 10 min para remoção dos parasitas. O sobrenadante de 2 horas de infecção foi imediatamente armazenado após a remoção dos parasitos e outra alíquota foi recolocada na placa contendo células por mais 22 horas, para obtermos o sobrenadante de 24 horas após a infecção. Culturas de células THP-1 não infectadas foram utilizadas como controles. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -20°C.

Os sobrenadantes provenientes do cultivo das células THP-1 infectadas ou não infectadas foram utilizados em células epiteliais HEK293T e LLC-MK2 com o objetivo de verificar seu efeito no processo de invasão pelo *T. cruzi*, considerando que as células THP-1 diferenciadas produzem quantidade expressiva de fatores pró-inflamatórios como, por exemplo, TNF, após infecção ou estímulo inflamatório.

Para isso, células HEK293T e LLC-MK2 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 24 horas de plaqueamento, ambas foram tratadas com os sobrenadantes previamente coletados por 6 horas. Os sobrenadantes utilizados foram: sobrenadante de células THP-1 não infectadas; sobrenadante de células THP-1 infectadas por 2 horas e sobrenadante de células THP-1 após 24 horas de infecção. Posteriormente, as células foram infectadas por 2 horas com cepa Y de *T. cruzi*, como já descrito, e após 24 horas as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como descrito no item 3.5.

Para o ensaio de neutralização de TNF com anticorpo específico utilizamos o fármaco comercial Infliximab (Remicade - Schering-Plough). Células HEK293T e LLC-MK2 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro e após 24 horas receberam os seguintes tratamentos:

- i) 1µg de infliximab por 30 minutos seguido de incubação, por 6 horas, com meio DMEM-10%SFB;
- ii) incubação, por 6 horas, com sobrenadante de células THP-1 coletado 2 horas após infecção;
- iii) incubação, por 6 horas, com sobrenadante de células THP-1 coletado 2 horas após infecção e inativados previamente com 1µg ou 10µg de infliximab.

Após esses tratamentos, as células foram infectadas com cepa Y de *T. cruzi* por 2 horas como já descrito anteriormente. Após 24 horas, as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como já descrito.

Para verificarmos o papel dos fatores secretados pelas células THP-1 infectadas pelo *T. cruzi* na taxa de infecção e no número de parasitas intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2, realizamos os experimentos em placas de 24 poços contendo *transwell* (Corning –cat.n# 3413 com 0,4µm de tamanho de poro) que permitem a troca de substâncias entre as células plaqueadas nos diferentes compartimentos. Primeiramente células THP-1 na concentração de 1×10^5 foram plaqueadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SFB, 1% P/S, 1% de glutamina e 100 nM de PMA por 48 horas no inserto do *transwell*. Após sua diferenciação, os insertos contendo células THP-1 foram transferidos para placas de 24 poços contendo lamínulas onde, no dia anterior havia sido plaqueadas as duas linhagens de células epiteliais na concentração de $1,5 \times 10^5$ por poço. Nesse momento, as células THP-1 no inserto foram infectadas com cepa Y de *T. cruzi* (10 parasitos: 1 célula) por 2 horas. Após 2 horas, o meio das células THP-1 contendo parasitos foi centrifugado a 3000 x rpm por 10 min para separação dos parasitos e o meio livre de parasitos foi re-adicionado ao inserto contendo células THP-1 por mais 6 horas. Após esse período, o inserto foi removido da placa e as células HEK293T e LLC-MK2 foram lavadas com PBS por 3 vezes e infectadas por 2 horas com *T. cruzi*. Após a infecção, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes e novo meio adicionado. Vinte-quatro horas após a infecção, as células foram fixadas com PFA 4% por 16-18 horas, coradas com DAPI e a taxa de infecção determinada como descrito no item 3.5.

3.10. Ensaio de adesão de parasitos às células

Para o ensaio de adesão seguimos o protocolo descrito em Schenkman *et al.* (1991). Células HEK293T e LLC-MK2 foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Após 24 horas de plaqueamento, ambos os tipos celulares foram lavados, tratados ou não por 6 horas com 20 ng/ml de TNF e após o tratamento lavados com solução salina de Hanks (CaCl₂ 1,26mM; MgCl₂-6H₂O 0,493mM; MgSO₄-7H₂O 0,407mM; KCl 5,33mM; KH₂PO₄ 0,441mM; NaHCO₃ 4,17mM; NaCl 137,93mM; Na₂HPO₄ 0,338 mM; D-glucose 5,56mM) e pré-fixados com glutaraldeído (grade I -Sigma-Aldrich) 2% em PBS. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 24 horas com etanolamina (Sigma-Aldrich) 0,16M (pH 8,3) à 4^oC. Após esse período as células foram lavadas com PBS e com meio DMEM (pH 7,4) contendo 20mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid – Sigma Aldrich) e 0,2% BSA (albumina sérica bovina – Sigma Aldrich). Antes de serem incubados com as células, os parasitos da cepa Y de *T. cruzi* foram ressuspensos nesse mesmo meio DMEM-BSA. As células foram incubadas na proporção de 10 parasitos para cada célula por 2 horas. Ao final da incubação, as células foram gentilmente lavadas com solução salina de Hanks, para remoção dos parasitos não aderidos, fixadas com solução de Bouin e coradas com solução de Giemsa. Em ambos os tipos celulares, tratados ou não com TNF, contamos o número de parasitos aderidos à superfície das células. Em cada lamínula foram contados de 10-15 campos aleatórios, totalizando um número mínimo de 250 células, e os experimentos foram realizados em triplicata.

3.11. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (SD). Para comparação entre os grupos, utilizou-se análise de variância One-way ANOVA com aplicação de pós teste. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Todas as análises foram realizadas no Software GraphPad Prism 4.0.

Resultados

4 Resultados

4.1 Efeito do tratamento de células HEK293T e LLC-MK2 com TNF sobre a taxa de infecção com cepa Y de *T. cruzi*.

O tratamento de células HEK293T e LLC-MK2 com TNF, previamente à infecção com cepa Y de *T. cruzi*, aumenta a taxa de infecção dessas células em, aproximadamente, duas vezes (FIG 3). A taxa de infecção de células LLC-MK2 é cerca de 2 vezes maior que nas células HEK293T, com e sem estímulo com TNF.

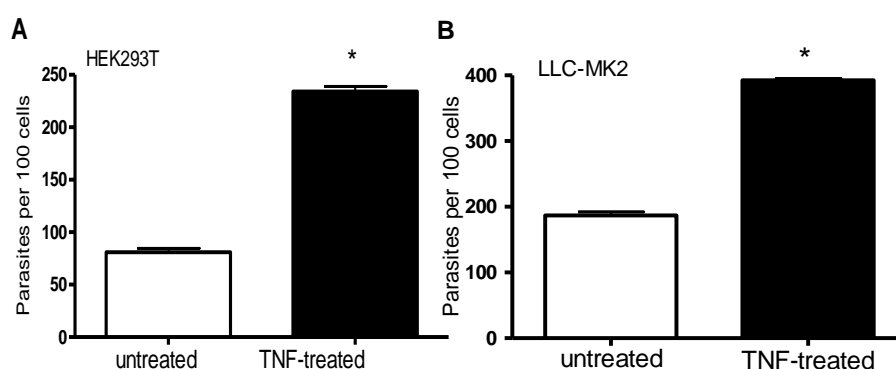


Figura 3: Taxa de infecção em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas por 6 horas com 20ng/ml de TNF e, posteriormente, infectadas por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Após 24 horas infecção as células foram fixadas e coradas com DAPI para contagem do número de parasitas intracelulares. * indicam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

A Figura 4 representa o padrão de infecção de células LLC-MK2 com cepa Y de *T. cruzi*, previamente estimuladas ou não com o TNF. Como demonstrado na figura, as células tratadas previamente com TNF apresentam um número maior de parasitas intracelulares, quando comparadas com as não tratadas.

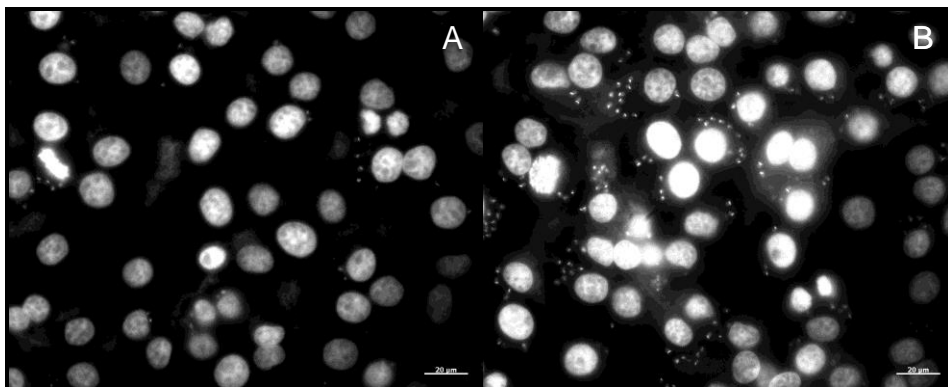


Figura 4: Fotomicrografia de células LLC-MK2 tratadas ou não por 6 horas com 20ng/ml de TNF e, posteriormente, infectadas por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. A: não tratadas com TNF, B: tratadas com 20ng/ml de TNF por 6 horas. As células foram fixadas após 24 horas de infecção. Coloração com DAPI (1:1000). Barra= 20 μ m.

Como pode ser observado na figura 5, o tratamento prévio das células com TNF não altera somente o número de parasitos em cada célula, ou seja, o que chamamos de taxa de infecção, ele altera a porcentagem de células infectadas. O tratamento com TNF aumenta a porcentagem de células infectadas com cepa Y de *T. cruzi* em ambos os tipos celulares.

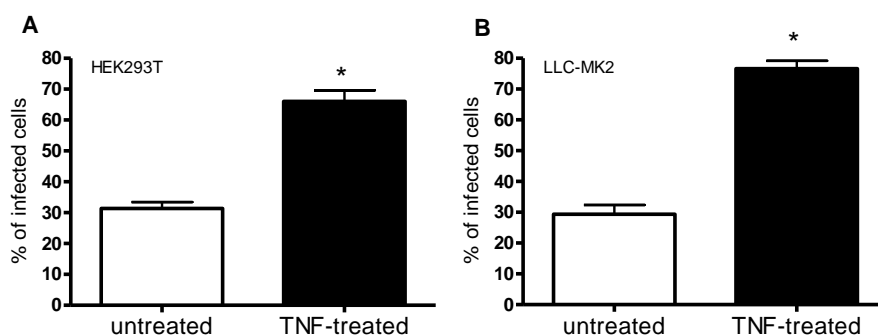


Figura 5: Porcentagem de células HEK293T e LLC-MK2 infectadas com cepa Y de *T. cruzi*. As células foram tratadas por 6 horas com 20ng/ml de TNF e, posteriormente, infectadas por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Após 24 horas infecção as células foram fixadas e coradas com DAPI para contagem do número de parasitas intracelulares * indicam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

O tratamento de células HEK293T e LLC-MK2 com diferentes concentrações de TNF, por 6 horas, demonstra o efeito dose-dependente sobre a taxa de infecção com cepa Y de *T. cruzi*. (FIGURA 6).

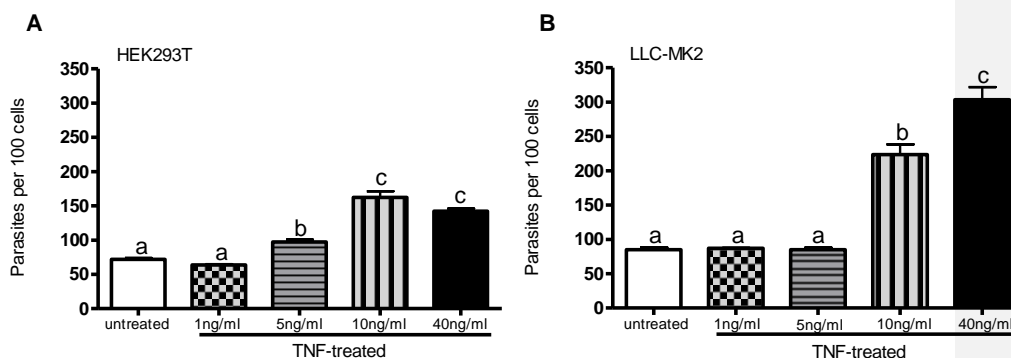


Figura 6: Taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 estimuladas por diferentes concentrações de TNF(1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml e 40ng/ml) por 6h e posteriormente infectadas, por 2 horas, com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Letras diferentes representam grupos com significância estatística ($p < 0,05$).

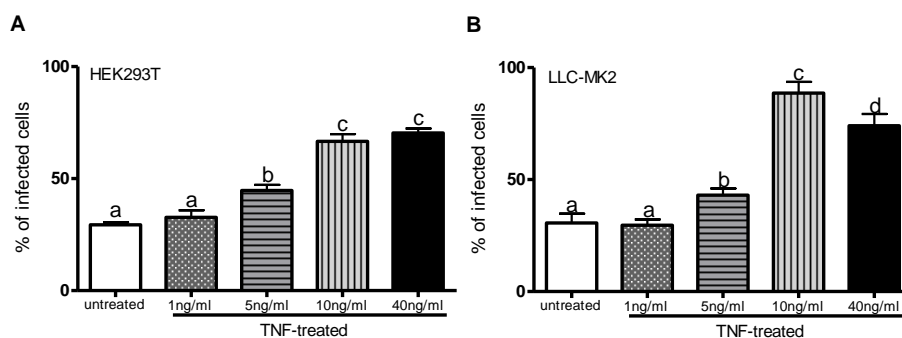


Figura 7: Porcentagem de células HEK293T e LLC-MK2 infectadas. As células foram estimuladas por diferentes concentrações de TNF(1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml e 40ng/ml) por 6h e posteriormente infectadas, por 2 horas, com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Letras diferentes representam grupos com significância estatística ($p < 0,05$).

A taxa de infecção de ambos os tipos celulares relaciona-se à concentração de TNF, ou seja, o número de parasitos intracelulares é maior em decorrência de doses maiores dessa citocina. As células HEK293T respondem ao estímulo por TNF na concentração igual ou superior a 5 ng/ml e parecem atingir um limite de estímulo na dose de 40 ng/ml. Esta dose não induz taxa de infecção superior à dose de 10 ng/ml de TNF.

Já as células LLC-MK2 respondem ao estímulo por TNF de modo progressivo, o que pode ser observado a partir da concentração de 10 ng/ml.

O tratamento com diferentes concentrações de TNF também mostra que o aumento no número de células infectadas parece ter um comportamento dose-dependente (FIGURA 7). Para as células HEK293T a porcentagem de células infectadas aumenta a partir da concentração de 5 ng/ml e parece atingir um platô com 10 ng/ml. As células LLC-MK2 também aumentam a porcentagem de células infectadas com a concentração de 5 ng/ml e dobram essa quantidade com 10ng/ml. A concentração de 40ng/ml diminuiu a porcentagem de células infectadas para esse tipo celular, diferentemente das células HEK293T.

Esses resultados sugerem que a ativação dessas células pelo TNF deve envolver vias de sinalização intracelular específicas que promovam a susceptibilidade de células epiteliais à infecção.

4.2 Efeito do tratamento com TNF sobre taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 com cepa Y de *T. cruzi*, ao longo de 24 horas.

Para determinar se o aumento no número de parasitos intracelulares é devido à facilitação da invasão, as células tratadas com o TNF foram infectadas com o *T. cruzi* em diferentes intervalos de tempo. Em ambos os tipos celulares, o

tratamento com TNF aumenta o número de parasitos intracelulares em todos os períodos analisados, ou seja, 2, 4, 6, 8, 16 e 24 horas após infecção com cepa Y de *T. cruzi* (FIGURA 8).

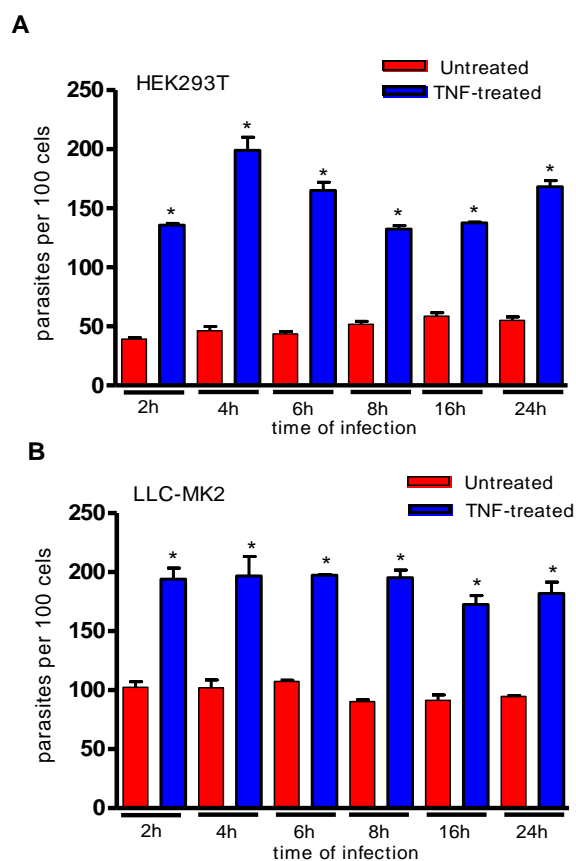


Figura 8: Taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 tratadas com 20 ng/ml de TNF por 6 horas e, posteriormente, infectadas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* por 2 horas. Avaliou-se o número de parasitos intracelulares em 0, 2, 4, 8, 16 e 24h após a infecção. Após cada um desses tempos, as células foram fixadas e coradas para determinar o número de parasitas intracelulares. Nos períodos inferiores a 8 horas de infecção, a taxa de infecção foi determinada pela diferença entre o número de parasitas totais (DAPI-positivos) e os parasitas corados pela imunohistoquímica para *T. cruzi* (parasitas extracelulares). *Indica significância em relação ao controle de mesmo período de infecção.

Esse resultado indica que o TNF atua sobre o processo de invasão da célula hospedeira pelo parasito, tendo em vista que o número de parasitos

intracelulares permanece sem alterações significativas no período de 2 a 24 horas após a infecção. Como já demonstrado anteriormente, a infecção em células LLC-MK2 parece ocorrer mais eficientemente do que em células HEK293T.

Para verificar se o cálcio intracelular estava envolvido no aumento da taxa de infecção após estímulo com TNF, utilizou-se a droga tapsigargina antes do estímulo com TNF em células HEK293T e LLC-MK2.

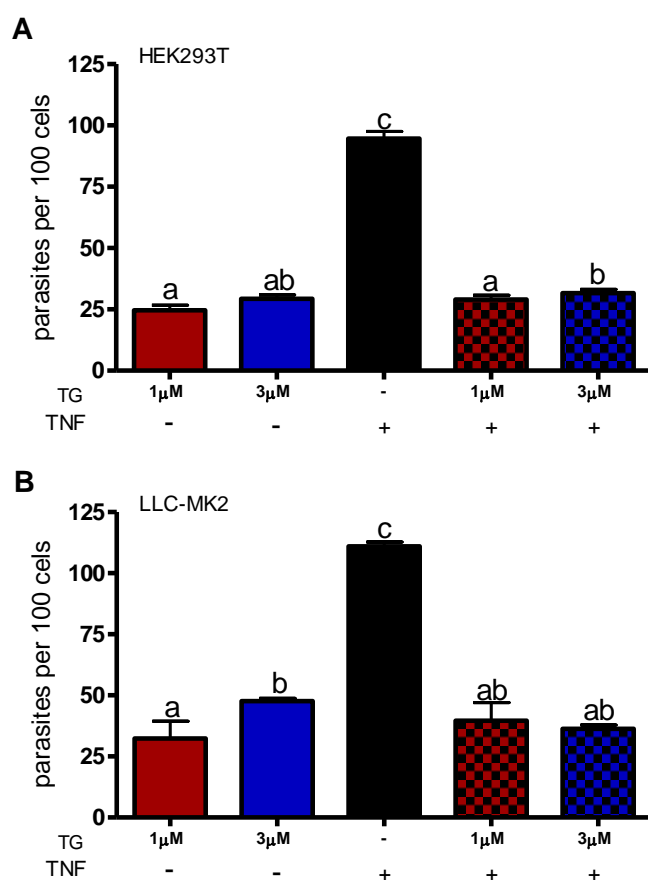


Figura 9: Taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 tratadas somente com Tapsigargina (1 μ M ou 3 μ M) por 30 minutos ou estimuladas com TNF(20ng/ml) por 6 horas e tratadas com duas concentrações de Tapsigargina (1 μ M e 3 μ M) por 30 minutos. Todas as condições foram infectadas, por 2 horas, com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, fixadas após 24 horas infecção e coradas com DAPI para determinação do número de parasitas intracelulares. Letras diferentes representam grupos com significância estatística ($p < 0,05$).

Como demonstrado no gráfico acima (FIGURA 9), o tratamento de ambos os tipos celulares com as duas doses de tapsigargina, na ausência de TNF, praticamente não altera a taxa de infecção. Mais uma vez demonstramos o efeito do TNF em aumentar a taxa de infecção em ambos os tipos celulares. Entretanto, quando tratamos as células HEK293T e LLC-MK2 com tapsigargina após o estímulo com TNF, verificamos uma redução na taxa de infecção induzida por TNF. Com base nesses dados podemos sugerir que o aumento na taxa de infecção induzido por TNF parece ser dependente da liberação dos íons cálcio de seus estoques citoplasmáticos.

4.3 Ensaio de viabilidade de células epiteliais após tratamento com TNF

Uma vez que o TNF é uma citocina com atividade citotóxica e pode ativar vias intracelulares que culminam na indução do programa de morte celular mediado por caspases, nós determinamos a viabilidade celular. O tratamento com diferentes concentrações de TNF, por 6 horas, não altera a viabilidade das células HEK293T e LLC-MK2. (FIGURA 10).

Este experimento nos permite afirmar que o aumento da taxa de infecção das células epiteliais HEK293T e LLC-MK2, após tratamento com o TNF, não está relacionado à perda de viabilidade celular, o que poderia indicar maior susceptibilidade dessas células nessas condições.

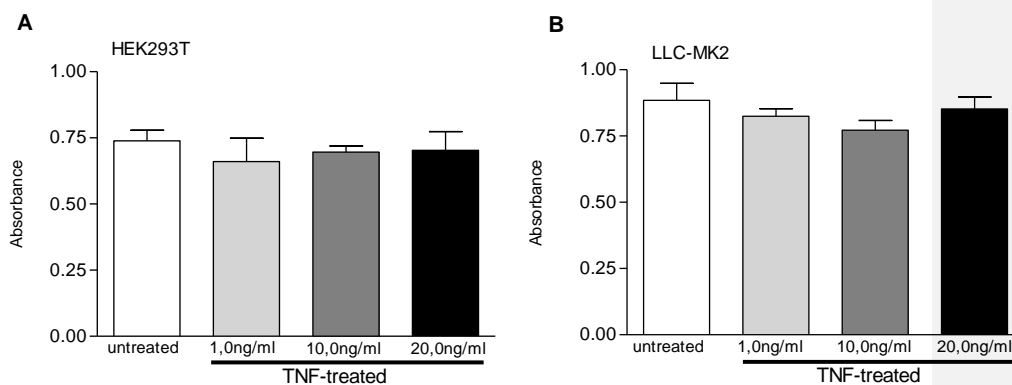


Figura 10: Ensaio de viabilidade, por MTT, em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas por 6 horas com diferentes concentrações de TNF(0, 1, 10 e 20ng/ml).

4.4 Efeito da inibição de NF- κ B sobre a taxa de infecção das células HEK293T e LLC-MK2 estimuladas por TNF.

Após se ligar ao seu receptor, o TNF dispara a ativação de NF- κ B. Portanto, para investigar qual é o efeito da inibição da ativação de NF- κ B induzida pelo TNF sobre o número de parasitos intracelulares, as células HEK293T ou LLC-MK2 foram pré-tratadas com o inibidor farmacológico TPCK em diferentes concentrações, depois estimuladas com o TNF, e então infectadas com o *T. cruzi*.

Conforme pode ser observado na figura 11, o tratamento com TPCK não altera o número de parasitos intracelulares em ambas as células epiteliais não estimuladas com TNF.

O tratamento com o TNF aumenta significativamente o número de amastigotas em ambas às células epiteliais, corroborando os resultados já descritos no item 4.2.

Por outro lado, as células epiteliais estimuladas com o TNF, porém na presença do TPCK, exibem menor taxa de infecção com cepa Y de *T. cruzi*. No entanto, a dose mínima de TPCK necessária para a inibição de NF- κ B é diferente em cada uma das células epiteliais.

Nas células HEK293T estimuladas com TNF, a dose de 5 μ M de TPCK é capaz de inibir o efeito do TNF sobre a taxa de infecção. Já nas células LLC-MK2, este mesmo efeito inibitório na taxa de infecção é observado com a dose de 1 μ M de TPCK (FIGURA 11).

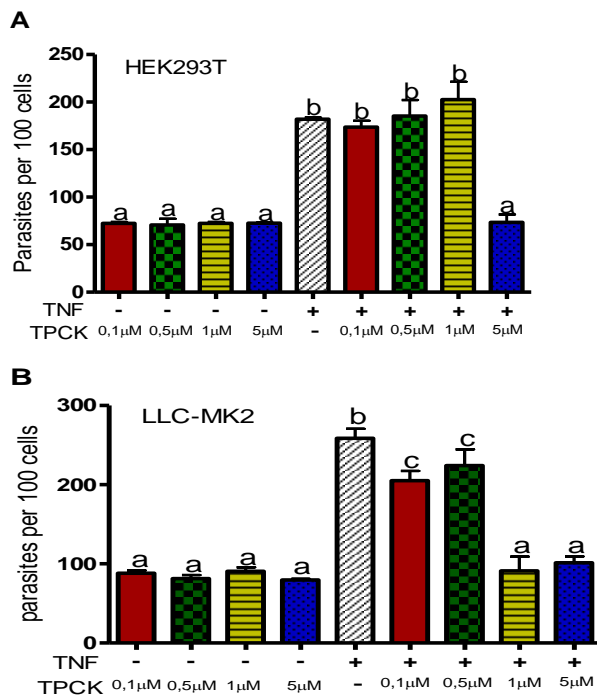


Figura 11: Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas com diferentes concentrações de TPCK e tratadas ou não com 20ng/ml de TNF por 6h e, posteriormente, infectadas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Após 24 horas de infecção as células foram fixadas e coradas com DAPI para determinar o número de parasitas intracelulares. Letras diferentes representam grupos que apresentam diferenças estatísticas, $p < 0,05$.

Como podemos observar na figura 12, o tratamento com TPCK na ausência de TNF, não altera a porcentagem de células infectadas, tanto para células HEK293T quanto para LLC-MK2. O tratamento com TNF aumenta a porcentagem de células infectadas para ambos os tipos celulares estudados. Para as células HEK293T, o tratamento prévio com TPCK, diminui o número de células infectadas quando utilizada a concentração de 5μM. Já para as células LLC-MK2, essa diminuição no número de células infectadas acontece a partir da concentração de 1μM.

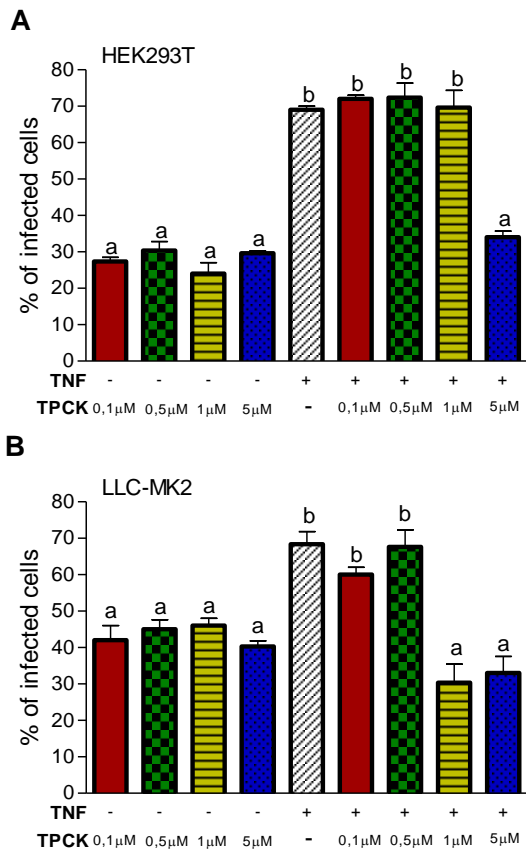


Figura 12: Porcentagem de células HEK293T e LLC-MK2 infectadas. As células foram tratadas com diferentes concentrações de TPCK e tratadas ou não com 20ng/ml de TNF por 6h e, posteriormente, infectadas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Após 24 horas de infecção as células foram fixadas e coradas com DAPI para determinar o número de parasitas intracelulares. Letras diferentes representam grupos que apresentam diferenças estatísticas, $p < 0,05$.

A droga TPCK é um inibidor irreversível de cisteíno-proteases e inibe a ativação do fator de transcrição NF- κ B (Kim, *et al.*, 1995). Esses resultados mostram que a taxa de infecção das células epiteliais HEK293T e LLC-MK2 com cepa Y de *T. cruzi* está diretamente relacionada à ativação de NF- κ B induzida por TNF.

Para confirmarmos o papel de NF- κ B na via ativada por TNF em nosso modelo, utilizamos um plasmídeo dominante negativo de uma molécula responsável por ativar diretamente NF- κ B, o I κ B.

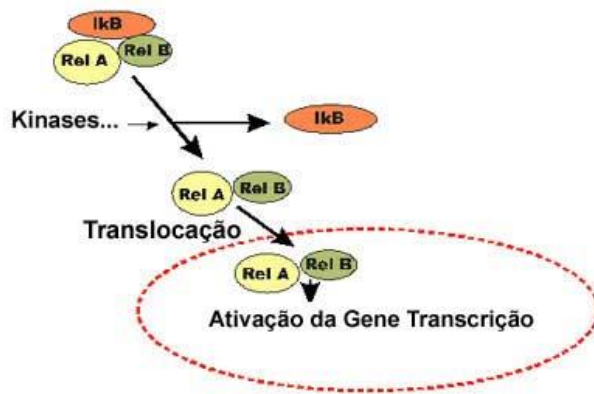


Figura 13: Mecanismo de ativação de NF- κ B dependente da fosforilação de I κ B.

(<http://www.asma-bronquica.com.br/images/08FigGeneTranscricaoWS.jpg>).

Primeiramente, determinamos se o dominante negativo (DN) para I κ B α era eficaz em inibir a ativação de NF- κ B.

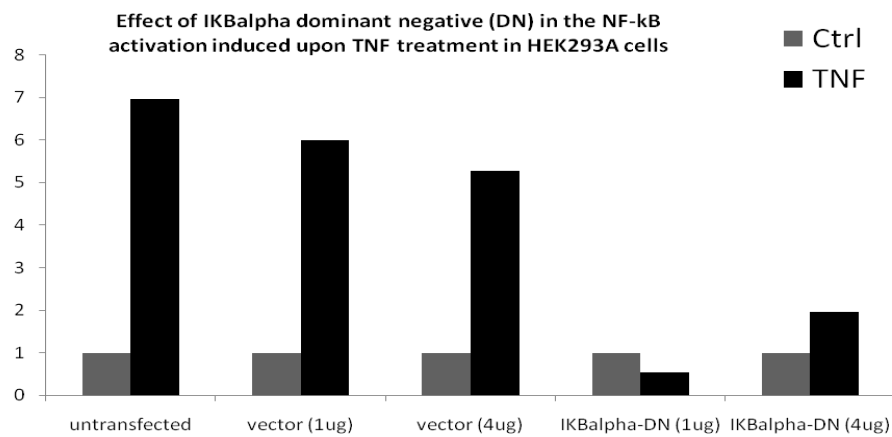


Figura 14: Efeito do dominante negativo (DN) de I κ B α na ativação de NF- κ B induzida por tratamento com TNF em células HEK293A. Células HEK293T apresentando confluência de 85% e cultivadas em placas de 24 wells, foram transfectadas com o plasmídeo repórter de NF- κ B (pGL3-E-Sel) e normalizador (pRL-TK) e com os plasmídeos indicados na parte inferior da figura. Após 36 horas, o meio foi desprezado e à monocamada de cada poço foram adicionados 200 μ L de tampão de lise passiva fornecido pelo kit Dual Luciferase Reporter System da Promega. Cinco microlitros de cada extrato celular foram analisados quanto à intensidade de luminescência capturada em luminômetro Lumicount

Como podemos observar na figura 14, a transfecção com o plasmídeo vetor não altera de forma proeminente a magnitude de ativação de NF- κ B após tratamento com TNF, mesmo quando as células são transfectadas com 4 μ g do vetor. Entretanto, quando as células foram transfectadas com o plasmídeo DN I κ B α , não observamos ativação significativa de NF- κ B mesmo após tratamento com TNF.

Realizamos então a transfecção de células HEK293T com 3 concentrações de plasmídeo vetor e 3 concentrações do plasmídeo DN I κ B α e comparamos o número de parasitos em cada condição após tratamento ou não com TNF (FIGURA 15).

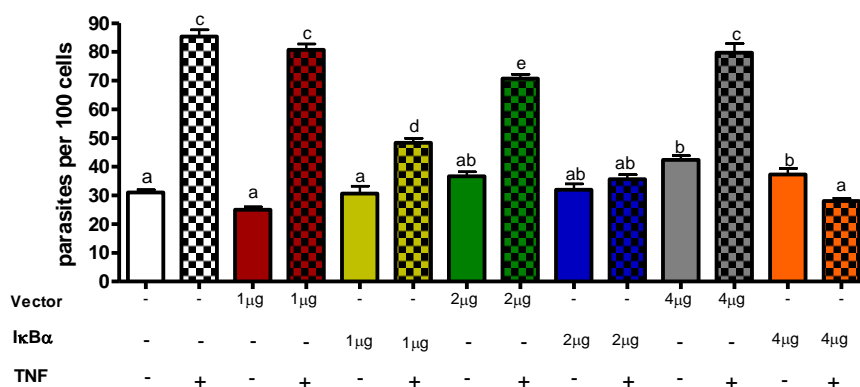


Figura 15: Taxa de infecção de células HEK293T transfectadas, ou não, com 3 concentrações (1, 2 ou 4µg) de plasmídeos pCDNA3, ou DN IκBα e, após 24 horas, tratadas ou não com 20ng/ml de TNF por 6 horas e infectadas por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Após 2 horas de infecção as células foram fixadas a taxa de infecção foi determinada pela diferença entre o número de parasitas totais (DAPI-positivos) e os parasitas corados pela imunohistoquímica para *T. cruzi* (parasitas extracelulares). Letras diferentes representam grupos com significância estatística ($p < 0,05$).

Como podemos observar na figura 15, células não transfectadas e tratadas com TNF possuem um número 3 vezes maior de amastigotas quando comparadas aos seus controles não tratados com a droga. Com relação às células HEK293T transfectadas com plasmídeo vetor podemos observar que de forma geral, a transfecção não alterou o padrão de infecção na ausência ou presença de TNF, especialmente nas concentrações de 1 e 2µg de plasmídeo. Nas células transfectadas com 4µg de plasmídeo controle e não tratadas com TNF houve um pequeno aumento do número de parasitos intracelulares. O aumento na concentração de plasmídeo pode ter sido danoso para a célula, facilitando assim a entrada do parasito.

Com relação às células HEK293T transfectadas com plasmídeo DN IκBα podemos observar que, de forma geral, as células transfectadas e tratadas com TNF tiveram o número de parasitos intracelular significativamente reduzido, quando comparamos com as células não transfectadas ou transfectadas com plasmídeo vetor. Quando comparamos as células transfectadas com DN IκBα em relação ao efeito do tratamento com TNF, podemos observar que para concentração de 1µg, as células tratadas com TNF ainda possuem uma taxa de infecção maior que as não tratadas, apesar de reduzida quando comparadas com as células não transfectadas e tratadas. Nas células transfectadas com 2µg

DN1κBα e tratadas com TNF, à taxa de infecção é igual às transfectadas com o mesmo plasmídeo e não tratadas, e similar aos níveis das células não transfectadas e não tratadas com TNF. Já as células transfectadas com 4μg DN1κBα e tratadas com TNF, a taxa de infecção é menor que nas transfectadas com o mesmo plasmídeo e não tratadas e semelhante a das células não transfectadas e não tratadas com TNF.

Como podemos observar com esses dados, a diminuição na taxa de infecção após transfecção com DN1κBα e sob estímulo de TNF parece ser dose-dependente da concentração do plasmídeo.

4.5 Efeito do sobrenadante de células THP-1 sobre a taxa de infecção em células epiteliais HEK293T e LLC-MK2 infectadas com cepa Y de *T. cruzi*.

As células THP-1 diferenciadas com PMA mostraram-se passíveis de infecção pela cepa Y de *T. cruzi*. Como pode ser observado, ocorre um aumento do número de parasitos intracelulares ao longo da infecção (FIGURA 16).

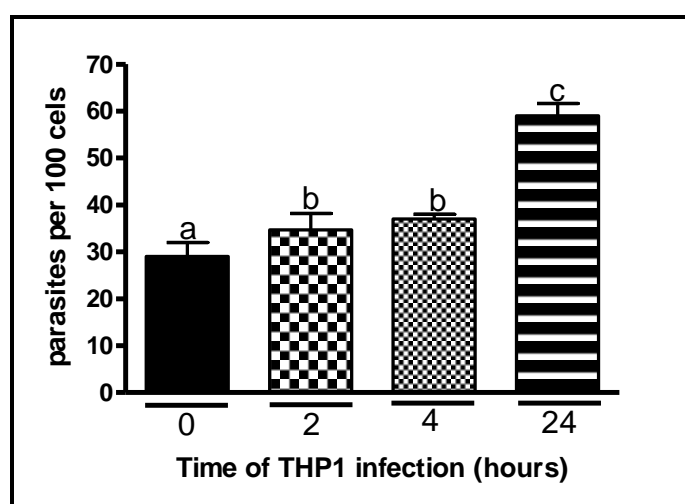


Figura 16: Número de parasitos intracelulares em diferentes tempos após infecção de células THP-1, diferenciadas por PMA e, posteriormente infectadas por 2 horas com cepa Y de

Trypanosoma cruzi. As células foram fixadas após cada um dos períodos de tempo determinados e naqueles inferiores há 4 horas, a taxa de infecção foi determinada pela diferença entre o número de parasitas totais (DAPI-positivos) e os parasitas corados pela imunohistoquímica para *T. cruzi* (parasitas extracelulares). Letras diferentes representam grupos com significância estatística ($p < 0,05$).

Tendo em vista esse resultado, os sobrenadantes de cultura das células THP-1 não-infectadas e das infectadas por 2 e 24 horas foram coletados para posteriormente serem utilizados em células HEK293T ou LLC-MK2 antes da infecção com o *T. cruzi*.

Primeiramente resolvemos verificar se os sobrenadantes de culturas de células THP-1 infectadas por 2 e 24 horas era capaz de ativar NF- κ B (FIGURA 17).

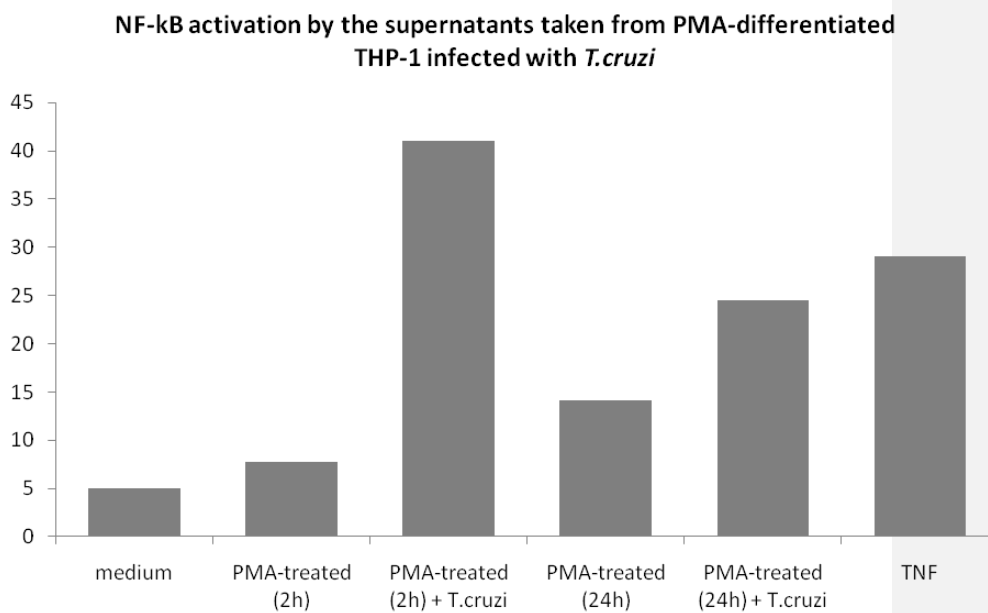


Figura 17: Ativação de NF- κ B pelo sobrenadante de células THP-1 infectadas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi* por 2 e 24 horas.

Como podemos observar no gráfico acima (FIGURA 17), ambos os sobrenadantes de células THP-1 infectados por *T. cruzi* são capazes de ativar NF- κ B, entretanto, o sobrenadante de THP-1 infectado por 2 horas é o que induz os maiores níveis de ativação, sendo um melhor ativador que o próprio TNF.

Paralelamente, para fornecer evidências que os macrófagos THP-1 são ativados durante a infecção pelo *T. cruzi*, extratos celulares foram obtidos após diferentes intervalos de infecção e submetidos à análise, por western-bot, da fosforilação de p38 MAPK, uma proteína cinase ativada em resposta a uma diversidade de estresses celulares e que é também importante para a regulação pós-transcricional do mRNA de TNF. Os resultados mostram que a p38 MAPK é rapidamente e fortemente ativada pela cepa Y de *T. cruzi* em células THP-1 tão logo quanto 15 minutos após a infecção, atingindo um nível intenso de fosforilação aos 30 minutos e ocorrendo diminuição aos 60 minutos (FIGURA 18)

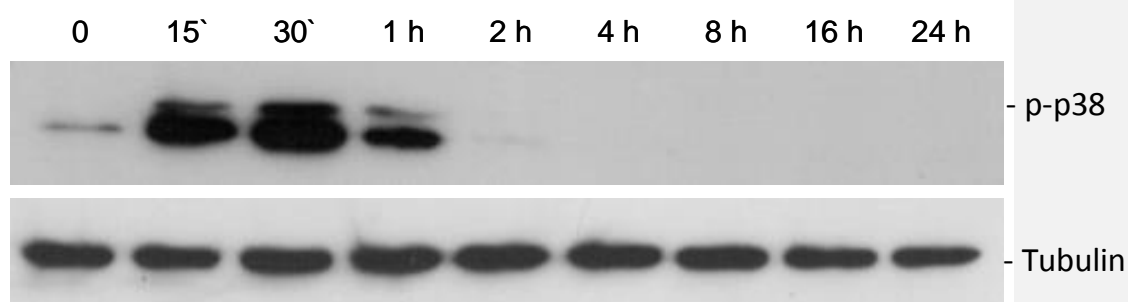


Figura 18: Análise, por western blot, da fosforilação de p38 MAPK em células THP-1 após infecção em diferentes intervalos de tempo com a cepa Y de *T. cruzi*. Ao final do tempo de cada infecção (indicado no topo da figura), o meio foi desprezado, as células foram lavadas em PBS 1X e então foram adicionados 200 μ L de tampão de lise de proteínas. Após quantificação por ensaio de Bradford, trinta microgramas de cada extrato foram submetidos à SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-fosfo-p38 MAPK (1:1.000) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a HRP. A revelação foi realizada com ECL plus (GE Healthcare). Após várias lavagens, a membrana foi posteriormente incubada com anticorpos primário anti-tubulina e secundário anti-IgG de camundongo conjugado a HRP para normalização das quantidades aplicadas por canaleta.

As células epiteliais HEK293T e LLC-MK2 tratadas com o sobrenadante de cultura das células THP-1 infectadas por 2 horas apresentam maior número de parasitos intracelulares que as células epiteliais tratadas com o sobrenadante de cultura das células THP-1 não infectadas (FIGURA 19).

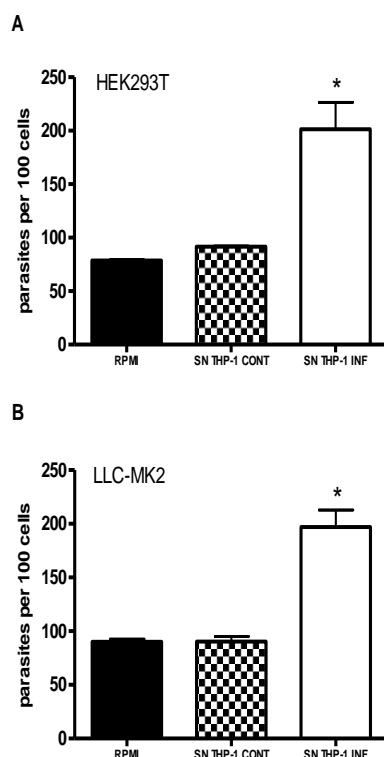


Figura 19: Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas por 6 horas com meio condicionado por células THP1 e, posteriormente, infectadas por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As células foram fixadas após 24 horas de infecção e coradas com DAPI para determinar a taxa de infecção. * Indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). RPMI (meio RPMI-1640), SN THP-1 CONT (sobrenadante de células THP-1 não infectadas), SN THP-1 INF (sobrenadante de células THP-1 infectadas por 2 horas com *T. cruzi*)

Com objetivo de reproduzir esses resultados de forma mais fisiológica, realizamos experimentos similares com os dois tipos celulares utilizando uma placa de transwell que permite a interação dos produtos secretados pelas células plaquedas nos diferentes compartimentos. Como já descrito anteriormente, os monócitos THP-1 foram plaqueados e diferenciados na parte superior da placa, no

transwell e, quando infectados com cepa Y de *T. cruzi*, colocados sobre as células HEK293T e LLC-MK2 já crescidas em lamínulas de vidro em placas de 24 poços para que o estímulo pudesse ocorrer.

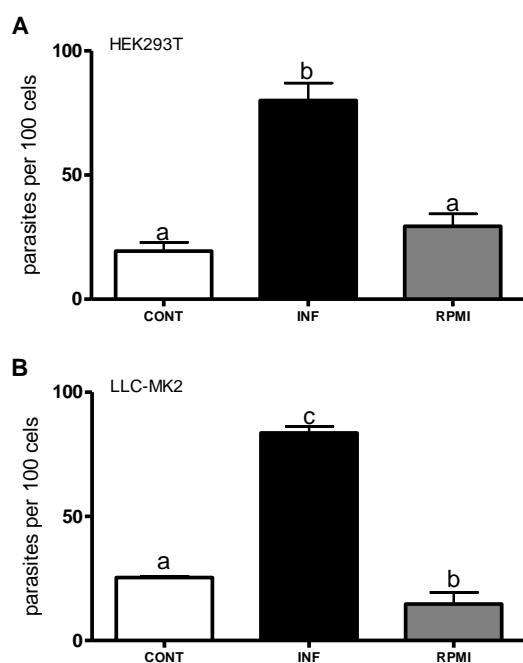


Figura 20: Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 crescidas na parte inferior do transwell, e estimuladas por 6 horas por células THP-1 crescidas e diferenciadas no transwell e infectadas ou não por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. As células HEK293T e LLC-MK2 foram infectadas por 2 horas com *T. cruzi* após as 6 horas sob estímulo das células THP-1. As células foram fixadas 24 horas após a infecção e coradas com DAPI para determinar a taxa de infecção. Letras diferentes representam grupos com significância estatística ($p < 0,05$). RPMI (meio RPMI-1640), CONT (células THP-1 não infectadas), SN THP-1 INF (células THP-1 infectadas por 2 horas com *T. cruzi*)

Como demonstrado no gráfico acima (FIGURA 20), as células HEK293T e LLC-MK2 estimuladas no transwell por células THP-1 infectadas com *T. cruzi*, apresentam um aumento na sua taxa de infecção, o que não ocorre naquelas estimuladas por células THP-1 não infectadas ou somente crescidas em meio RPMI. Esses resultados corroboram os nossos resultados obtidos utilizando o

sobrenadante de células THP-1, infectadas e não infectadas, demonstrado na figura 19.

Resultados preliminares obtidos a partir da dosagem de TNF por ELISA (Protocolo sugerido pela empresa Promega) mostram que os níveis de TNF no sobrenadante de células THP-1 após 2 horas de infecção são mais elevados (3.280,65 pg/ml) que no sobrenadante de células THP1 não infectadas (15,16 pg/ml). Esse resultado corrobora a idéia de que células fagocíticas profissionais como, por exemplo, os macrófagos, liberam fatores no meio extracelular que por sua vez podem atuar em outros diferentes tipos celulares adjacente como as células epiteliais no sítio de uma infecção.

Para verificar se o TNF estava envolvido no aumento da taxa de infecção de células HEK293T e LLC-MK2 tratadas com sobrenadante de THP-1 infectado por 2 horas, utilizamos um anticorpo específico TNF, infliximab, para neutralizá-lo nessas amostras.

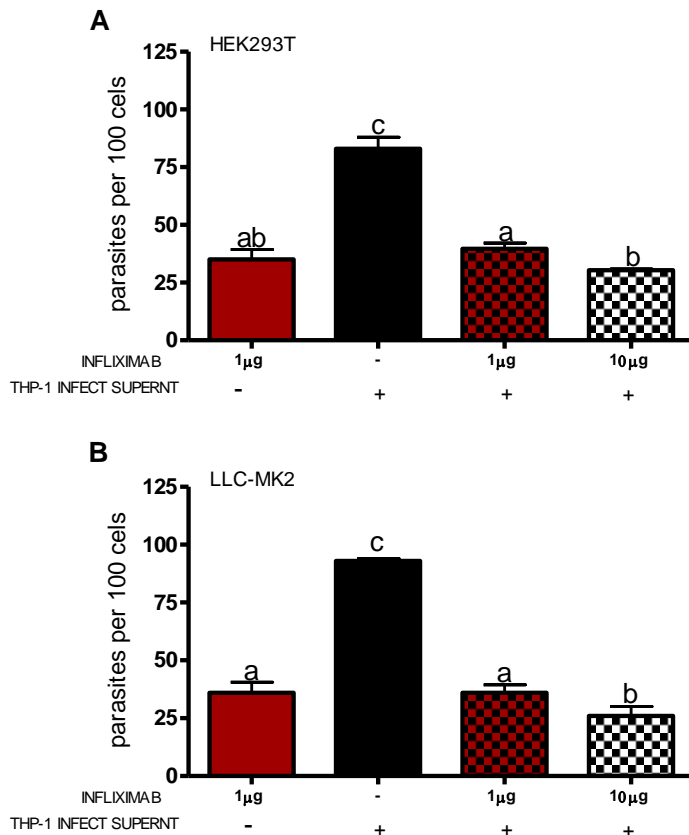


Figura 21: Número de parasitos intracelulares em células HEK293T e LLC-MK2 tratadas ou não com anticorpo anti-TNF (infiximab) por 30 minutos, ou por 6 horas com sobrenadante de células THP-1 infectadas por 2 horas com cepa Y de *T. cruzi*, ou após incubação por 6 horas com sobrenadante de células THP-1 infectadas por 2 horas e neutralizadas por 30 minutos com duas concentrações (1µg e 10µg) de anti-TNF. Após todas as condições, ambos os tipos celulares foram infectados por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. Letras diferentes representam grupos com significância estatística ($p < 0,05$). THP-1 INFECT SUPERNT (sobrenadante de células THP-1 infectadas por 2 horas com cepa Y de *T. cruzi*); INFLIXIMAB (anti-TNF).

Como demonstrado na figura 21, a taxa de infecção aumenta significativamente em ambos os tipos celulares tratados com sobrenadante de células THP-1 infectadas por 2 horas com cepa Y de *T. cruzi*, como já demonstrado anteriormente. O tratamento das células com o anticorpo anti-TNF, na ausência do sobrenadante de células THP-1 infectadas, não altera a taxa de infecção. Entretanto, quando incubamos o sobrenadante de células THP-1

infectadas por 2 horas com *T. cruzi* com o anticorpo anti-TNF por 30 minutos antes do tratamento das células, verificamos uma redução significativa na taxa de infecção, principalmente na concentração de 10µg de anti-TNF. Com base nesses resultados, podemos sugerir que o TNF tenha um papel importante no mecanismo envolvido no aumento do número de parasitos intracelulares em nosso modelo de estudo, uma vez que sua inibição específica reverte esse efeito.

4.6 Efeito do TNF na adesão de tripomastigotas da cepa Y na superfície de células HEK293T e LLC-MK2

Para verificarmos se o tratamento com TNF aumentava a adesão dos parasitos a superfície das células, realizamos o ensaio de adesão proposto por Schenkman *et al.* (1991).

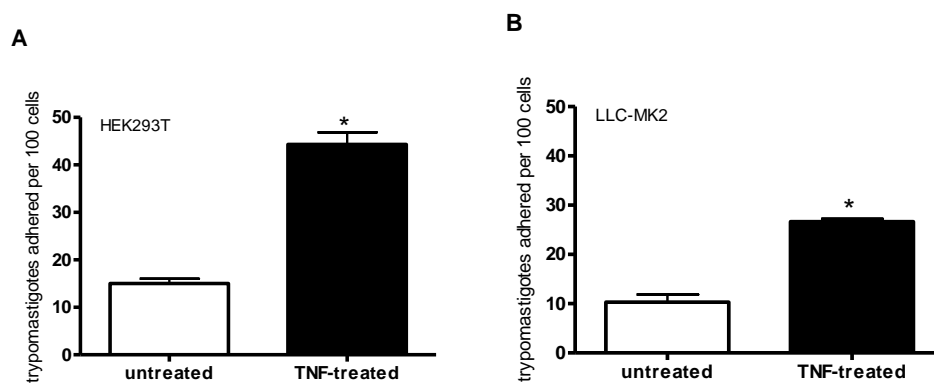


Figura 22: Número de tripomastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* aderidos a superfície das células HEK293T e LLC-MK2 após tratamento ou não com 20ng/ml TNF por 6 horas. Após o tratamento as células foram fixadas com glutaraldeído 2% por 5 minutos, incubadas com etanolamina 0,16M por 24 horas, infectadas por 2 horas com *T. cruzi*, fixadas com Bouin e coradas com solução de Giemsa. * indicam diferença significativa entre os grupos, $p < 0,05$.

Como podemos observar no gráfico acima (Figura 22), o tratamento com TNF aumentou o número de tripomastigotas aderidos à superfície de ambos os tipos celulares, quando comparados com as células não tratadas. O número de parasitos as células HEK293T após o tratamento com TNF foi superior ao da célula LLC-MK2.

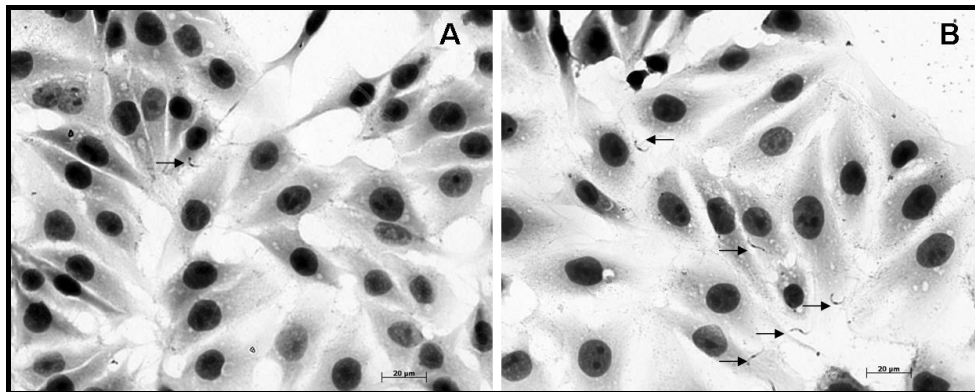


Figura 23: Fotomicrografia representando tripomastigotas aderidos à superfície de células LLC-MK2 tratadas ou não por 6 horas com 20ng/ml de TNF e, posteriormente, infectadas por 2 horas com cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. A: não tratadas com TNF, B: tratadas com 20ng/ml de TNF por 6 horas. Coloração com Giemsa. Barra= 20 µm. Setas: tripomastigotas.

Discussão

5. Discussão

Nosso trabalho demonstra pela primeira vez que o tratamento de células epiteliais com TNF aumenta sua permissividade à infecção pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. O fator de necrose tumoral, TNF, é uma citocina de amplo espectro de ação, atuando em diversos processos biológicos. Durante processos infecciosos, o gene que codifica para a proteína TNF é ativado e transcrito rapidamente e a proteína secretada no meio extracelular. A ação desta citocina nas células-alvo é regulada através de sua ligação com receptores específicos, levando a ativação de fatores de transcrição e a expressão de genes importantes no controle de diversos processos biológicos (Thommesen & Laegreid, 2005; Hatada, *et al.*, 2000).

Vários trabalhos já demonstraram que MAPK p38 regula a expressão de TNF em macrófagos humanos (Sun & Ding, 2006) Nossos resultados demonstraram que p38 MAPK é fosforilado rapidamente, 15 minutos após infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, em monócitos diferenciados THP-1. As MAPKs são cinases de resíduos serina/treonina envolvidas na transdução de sinais externos envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular e apoptose. Algumas dessas cinases são ERK-1 e 2, JNK-1 e 2 e p38. As MAPKs regulam diretamente a fosforilação de seus alvos, que incluem outras proteínas cinases, componentes do citoesqueleto e complexos/fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B (Seger & Krebs, 1995). Ropert, *et al.* (2001) demonstraram que mucinas-GPI de *T. cruzi* são capazes de induzir a fosforilação das vias ERK-1/ERK-2 e p38, além da proteína I κ B α em macrófagos peritoneais de camundongo. Nesse trabalho os autores também sugerem que, em macrófagos estimulados, a via de p38 está envolvida na síntese de TNF. Mukherjee *et al.*

(2004) demonstraram que a infecção por *T. cruzi* promove a ativação de ERK em células endoteliais e musculares lisas.

Inicialmente, acreditava-se que as citocinas eram produzidas somente por células do sistema imune, porém, sabe-se hoje em dia que células não imunes, incluindo células epiteliais, são capazes de produzi-las desempenhando importante papel na defesa do organismo (Hedges, *et al.*, 1995). Devido a sua localização entre o ambiente externo e os tecidos internos, as células epiteliais geralmente são as primeiras no contato com microorganismos patogênicos. Schuster & Schaub (2000) demonstram a cinética de penetração e disseminação de formas metacíclicas do *T. cruzi* após infecção cutânea em camundongos. Neste trabalho eles demonstram que a infecção natural, pelas fezes do vetor triatomíneo, é eficaz em disseminar a parasitemia mesmo que o tempo de exposição às formas de tripomastigotas metacíclicas seja somente de 5 minutos. Esta rápida propagação parasitária ocorre através dos vasos sanguíneos ou linfáticos. Assim que invadem o hospedeiro através da pele, os parasitos têm que confrontar uma resposta imune local, formada por células que migram para o sítio de lesão. Nas primeiras 24 horas após a infecção, essa resposta é caracterizada principalmente por células mononucleares e neutrófilos e posteriormente de basófilos e eosinófilos (Nascimento & Abrahamsohn, 1987). Um infiltrado de células mononucleares é observado nas primeiras 24 horas após a infecção, atingindo seu pico celular com 15 dias até não ser mais observado aos 30 dias pós infecção (Monteon *et al.*, 1996). Como podemos observar, o parasito está envolvido num ambiente pró-inflamatório desde o início da infecção, sendo capaz até mesmo de infectar as células do sistema imune, como os macrófagos. Baseando-se nesses dados, nós nos perguntamos como as células epiteliais que estão envolvidas nesse microambiente proinflamatório responderiam a infecção

pelo *T. cruzi*. Para mimetizar um ambiente próinflamatório, nós utilizamos a citocina TNF e dois tipos de células epiteliais: HEK293T e LLC-MK2.

O *T. cruzi* é capaz de se aderir e invadir diferentes tipos celulares, sendo esse processo dependente de moléculas tanto do hospedeiro quanto do parasito. Uma das moléculas do hospedeiro responsável pelo reconhecimento dessas moléculas de superfície é a família de receptores do tipo Toll (TLRs). Baseando-se nisso, escolhemos as células HEK293T como modelo de estudo pois estas não expressam TLR (Hornung *et al.*, 2002). Assim, poderíamos investigar o envolvimento dos TLRs na invasão pelo *T. cruzi*, especialmente TLR2 (Campos, *et al.*, 2001; Maganto-Garcia, *et al.*, 2008), TLR4 e TLR9. Outra característica importante dessas células é sua permissividade aos processos de transfecção, que seriam muito importantes nos nossos estudos utilizando o plasmídeo DN para I κ B α . As células LLC-MK2 tem sido amplamente utilizadas em modelos de estudo para *T. cruzi* e são um bom modelo para entender o mecanismo de invasão do parasito (Andrews *et al.*, 1984).

O tratamento de ambos os tipos celulares com TNF aumentou o número de parasitos intracelulares e esse aumento é dependente da concentração da citocina. Para sustentar ainda mais nossos resultados de invasão, nossos resultados de adesão demonstram que ambos os tipos celulares tratados com TNF apresentam um maior número de parasitos aderidos, sugerindo que o TNF possa promover a expressão de uma molécula de expressão ou receptor que favoreça a invasão. Esses resultados corroboram o trabalho de Dias *et al* (2008) que demonstram que a trans-sialidase (TS) ativa células endoteliais aumentando sua susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, *in vitro*. Além disso, eles mostram que o estímulo de células endoteliais pela TS promove ativação de NF- κ B, induz a

expressão de moléculas de adesão como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 e bloqueia apoptose induzida por privação de soro.

Huang et al (1999) também demonstraram que a infecção de células endoteliais com *T. cruzi* está associada com ativação de NF- κ B e a expressão das moléculas de adesão E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1. Em estudo sobre a penetração e proliferação de *Toxoplasma gondii* em células epiteliais da retina, em resposta a citocinas próinflamatórias, TNF e IFN- γ , Delair et al. (2009) sugerem um papel inibitório dessas citocinas na penetração e proliferação desse parasito, sendo esse fenômeno também dose-dependente. Essa diferença de resposta entre esse estudo e o nosso pode estar relacionada ao tipo de parasito e à via de infecção do hospedeiro, uma vez que as células da retina não são uma das primeiras a serem infectadas no curso da doença e nem estão envolvidas num ambiente próinflamatório inicial.

Neste trabalho, demonstramos que o aumento na taxa de infecção induzido por TNF ocorre nos primeiros momentos da infecção, corroborando a idéia que essa citocina facilita a invasão pelo *T. cruzi* e não sua multiplicação intracelular.

A ligação de TNF aos seus receptores pode induzir tanto uma resposta celular de sobrevivência/proinflamatória, mediada por NF- κ B, quanto uma resposta de morte celular por apoptose, dependendo do contexto celular. Sendo assim, decidimos investigar o papel do fator de transcrição NF- κ B no aumento da taxa de infecção induzido por TNF. Nas células de mamíferos, a família NF- κ B inclui 5 proteínas, p65/RelA, c-Rel, RelB, P50/p105/NF- κ B1 e p52/p100/ NF- κ B2 que são capazes de formar homo ou héterodímeros entre si (Perkins, 2007). Em células não estimuladas, o NF- κ B encontra-se no citoplasma associado a uma família de proteínas inibitórias (I κ B α , - β e - ϵ), permanecendo assim inativado. Várias moléculas podem atuar como ativadores de NF- κ B, como TNF e LPS,

induzindo a fosforilação de I κ B α , o que promove sua ubiquitinação e degradação. A liberação de NF- κ B (p65/p50) permite sua translocação para o núcleo onde induz a expressão de determinados genes envolvidos na resposta imune, sobrevivência e proliferação celular (Haecker & Karin, 2006). Os efeitos biológicos do NF- κ B podem ser inibidos tanto farmacologicamente quanto geneticamente. O composto TPCK é um inibidor de proteínases de serina/cisteína e é capaz de inibir a ativação de NF- κ B através do bloqueio da fosforilação e conseqüentemente da degradação de I κ B α , em diversos tipos celulares (Henkel, *et al.*, 1993; Finco, *et al.*, 1994; Ha, *et al.*, 2009). Quando ambos os tipos celulares foram tratados com TPCK antes do tratamento com TNF observamos redução significativa na taxa de infecção. Essa diminuição da taxa de infecção foi mais proeminente nas células LLC-MK2 tratadas com menores concentrações de TPCK.

Como ferramenta de bloqueio da função de uma proteína, utilizamos o plasmídeo pRcCMV-I κ B α -DN (Traenckner, *et al.*, 1995) para transfectar células HEK293T, já que essas possuem uma eficiência de transfecção muito superior as LLC-MK2 para o nosso método (dados não mostrados). Os nossos resultados mostram que todas as concentrações de plasmídeo pRcCMV-I κ B α -DN foram eficientes para diminuir a taxa de infecção de células tratadas com TNF, mas somente a partir da concentração de 2 μ g é que a diferença entre a taxa de infecção entre as células tratadas e não tratadas com TNF é abolida, eliminando assim o efeito do TNF em aumentar o número de parasitos intracelular. Baseados nesses resultados, tanto do TPCK quanto do DN I κ B α , podemos sugerir que o aumento na taxa de infecção para ambos os tipos celulares envolve a ativação de NF- κ B induzida por TNF.

A ligação de TNF ao seu receptor pode desencadear respostas tanto de sobrevivência e multiplicação celular, quanto de apoptose, dependendo do contexto celular. Robaye *et al* (1991) foram os primeiros a demonstrar os efeitos tóxicos e dose-dependentes do TNF em células endoteliais *in vitro*. Estudos *In vivo* também já demonstraram os efeitos tóxicos dessa citocina. A administração de TNF recombinante aumentou a mortalidade (Black, *et al.*, 1989) e o aumento dos níveis endógenos de TNF aumentaram a susceptibilidade (Russo, *et al.*, 1989) além de levarem os animais a caquexia e danos inflamatórios após infecção por *T. cruzi* (Truyens, *et al.*, 1995). Em nossos experimentos, TNF não induziu citotoxicidade nas concentrações testadas, de onde podemos concluir que o aumento do número de parasitos intracelulares encontrados nas células HEK293T e LLC-MK2 após tratamento com TNF não está relacionado com diminuição da viabilidade celular. A ligação de TNF ao seu receptor do tipo 1 (TNF-R1) pode ativar uma cascata de transdução de sinal que leva a célula à morte. Quando ativado, o TNF-R1 associado à TRADD (Domínio de morte associado ao TNFR) recruta a molécula FADD (Faz associado ao domínio de morte). Após ser recrutado, FADD recruta as moléculas prócaspases 8 e 10, que são prontamente ativadas. Essa ativação das procaspases é suficiente para iniciar a cascata de sinalização que levará a apoptose (Schneider-Brachert, *et al.*, 2004).

Petersen, *et al.*, (2006) demonstraram que a infecção pelo *T. cruzi* protege as células cardíacas, *in vitro*, de entrarem em apoptose induzida por TNF. Além disso, eles mostram que esse efeito anti-apoptótico está relacionado com a presença do parasito no interior da célula e com a ativação de NF- κ B. Nossos resultados mostram que o tratamento com TNF não induz a apoptose e que o meio condicionado por células THP-1 infectadas com *T. cruzi* é capaz de ativar NF- κ B. É possível que a sinalização de NF- κ B ativada primeiramente por TNF e

em seguida por *T. cruzi* possa estar protegendo o parasito contra apoptose celular em células epiteliais.

Hall *et al.*, (2000) demonstraram a ativação de NF- κ B em células não fagocíticas profissionais após a infecção com *T. cruzi*, mas com resultados contrários aos nossos. Neste trabalho, a habilidade do parasito em ativar NF- κ B é inversamente proporcional com a susceptibilidade celular à infecção. Esses autores mostram que células epiteliais transfectadas com I κ BaM/GFP, ou seja, incapazes de ativar NF- κ B, apresentam maior taxa de infecção. Em contrapartida, nossos dados indicam que a ativação de NF- κ B por TNF em dois modelos de célula epitelial aumenta a susceptibilidade dessas a infecção. É importante ressaltar duas diferenças entre nossos trabalhos. Hall *et al* (2000) não investigaram a ação do ambiente pró-inflamatório sobre a infecção das células não fagocíticas profissionais, ou seja, não utilizaram nenhuma citocina ou outro fator solúvel como ativador celular. Além disso, nossos grupos trabalham com isolados de *T. cruzi* diferentes. Nosso trabalho foi desenvolvido com a cepa Y de *T. cruzi* enquanto o dos outros autores utilizou os isolados Sívio, Tulahuen e MV13. Em trabalho recente, Adesse *et al.* (2010) demonstrou que a infecção com 4 isolados diferentes de *T. cruzi* (Y, CL Brener, Tulahuen e Brazil) induz 4 perfis gênicos diferentes em mioblastos L6E9, mostrando que cada isolado é capaz modular um tipo de resposta celular.

Células da linhagem macrófaga quando expostas a parasitos produzem IL-12 e TNF que ativam células NK a produzir IFN- γ . Essa resposta imune inicial é fundamental na resistência do hospedeiro contra diferentes tipos de parasitos intracelulares (Biron & Gazzinelli, 1995). Em nosso trabalho nós demonstramos que células THP-1 diferenciadas com PMA são capazes de serem infectadas com *T. cruzi* e secretam TNF após 2 horas de infecção. Quando utilizamos esses

sobrenadantes obtidos a partir de células THP-1, diferenciadas e infectadas por 2 horas, para tratar células HEK293T e LLC-MK2 obtivemos um aumento no número de parasitos intracelulares. Esse aumento foi abolido quando incubamos esse sobrenadante com o anticorpo anti-TNF infliximab antes do tratamento das células, sugerindo que o TNF está envolvido no aumento na taxa de infecção celular. Além disso, o experimento com transwell, que mimetiza esse experimento de forma mais fisiológica, produziu os mesmos resultados.

O fato de TNF aumentar a susceptibilidade de células epiteliais à infecção pelo *T. cruzi* parece indicar que a interação do parasito com a célula hospedeira depende de inúmeros fatores, dentre eles o microambiente em que ela está inserida. Como exemplos desse contexto in vivo, podemos citar estudos que mostram a predominância de linfócitos CD8+ e macrófagos secretores de TNF em focos inflamatórios do coração de pacientes chagásicos crônicos (Reis, *et al.*, 1993). Além disso, outros trabalhos já relacionaram a persistência do parasito com a intensidade do processo inflamatório em órgãos do sistema digestivo de humanos (Palomino *et al.*, 2000,) e em modelos experimentais (Zhang & Tarleton, 1999).

Nossos resultados demonstram que a ativação de NF- κ B por TNF participa na invasão de células epiteliais, promovendo um aumento no número de parasitos intracelulares. A ativação de NF- κ B por fatores parácrinos liberados por células imunes em células epiteliais apresenta-se como um mecanismo de persistência do parasito na célula hospedeira.

Conclusões

6 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que, em células epiteliais HEK293T e LLC-MK2:

i) a infecção com a cepa Y de *T. cruzi* é facilitada pela ativação de NF- κ B induzida pelo TNF;

ii) a ativação de NF- κ B parece ser desencadeada pela adesão do parasito à superfície da célula epitelial;

iii) o aumento do número de parasitas intracelulares induzido por TNF parece ser dependente de cálcio

Referências

7 Referências

1. Adesse D, Iacobas DA, Iacobas S, Garzoni LR, Meirelles Mde N, Tanowitz HB, Spray DC. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 May;82(5):846-54
2. Aliberti, J.C.S., Souto, J.T., Marino, A.P.M.P., Lannes-Vieira, J., Teixeira, M.M., Farber, J. Gazzinelli. R.T., Silva. J.S. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in Interferon- γ -and Tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *American J. of Pathology.* 2001; 158(4): 1433-1440.
3. Andrade, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: Brener, Z.; Andrade Z.A.; Barral-Netto, M. (Eds.), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* Guanabara Koogan R.J., 2000:177-200,
4. Andrews, N.W., and Colli, W. (1982) Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *J. Protozool.* 29, 264-269.
5. Andrews, N.W. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends Cell Biol.* 1995; 5: 133-137.
6. Araujo-Jorge, T.C.; Barbosa, H.S.; Meireles, M.N. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1992. 87 Suppl 5:43-56.
7. Barton, G.M., Medzhitov, R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science.* 2003; 300:1524-5.
8. Banerjee A, Gerondakis S. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85:420–4.

9. Biron CA, Gazzinelli RT. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr Opin Immunol.* 1995 Aug;7(4):485-96.
10. Black, C.M., Israelski, D.M., Suzuki, Y., and Remington, J.S. (1989) Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* 68, 570-574.
11. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol.* 1973; 27: 347-382
12. Burleigh, B.A. Host Cell Signaling and *Trypanosoma cruzi* Invasion: Do all roads lead to lysosomes? *Sci STKE.* 2005;pe36
13. Caler, E.V., Chakrabarti S., Fowler, K.T., Rao, S., Andrews, N.W. The exocytosis-regulatory protein synaptotagmin VII mediates cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.* 2001. 193: 1097-1104.
14. Campbell, D.A, Westenberger, S.J, Sturm, N.R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med.* 2004. 4: 549–62.
15. Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procopio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol.* 2001;167:416-23.
16. Carvalho, T.M. & de Souza, W. Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct Funct.* 1989; 45(6): 498-502
17. Chandrasekar, B., Melby, P.C., Troyer, D.A., Colston, J.T., Freeman, G.L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide

synthase in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Am J Pathol.* 1998, 152: 925-934.

18. Chaturvedi, A and Pierce, K.S. How location governs Toll like receptor signaling. *Traffic.* 2009 June ; 10(6): 621–628.

19. COPE (Cytokines online pathfinder encyclopaedia). Philippine University library. 1999, versão 4.0

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

21. Coura, J.R. Chagas Disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 2010, 465, suppl. 24/06/2020, S6-S7.

22. Delair E, Creuzet C, Dupouy-Camet J, Roisin MP. In vitro effect of TNF-alpha and IFN-gamma in retinal cell infection with *Toxoplasma gondii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(4):1754-60

23. Dias WB, Fajardo FD, Graça-Souza AV, Freire-de-Lima L, Vieira F, Girard MF, Bouteille B, Previato JO, Mendonça-Previato L, Todeschini AR. Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 2008 Jan;10(1):88-99.

24. Finco, T.S., Beg, A.A., and Baldwin, A.S., Jr. (1994) Inducible phosphorylation of I κ B alpha is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B and is inhibited by protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11884-11888.

25. Gupta, S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med.* 2001: 1, 317-324.

26. Ha K.H., Byun M.S., Choi J., Jeong J., Lee K.J., Jue D.M. (2009) N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone inhibits NF-kappaB activation by blocking specific cysteine residues of IkappaB kinase beta and p65/RelA. *Biochemistry* 48, 7271-8.
27. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006 17;2006(357):re13
28. Hall, B.S., Tam, W., Sen R., Pereira, M.E.A. Cell-specific activation of nuclear factor-kB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. 2000; 11:153-160.
29. Hatada, E.N., Krappmann, D., and Scheidereit, C. (2000) NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12, 52-58.
30. Hayden, M.S. and Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004; 18(18): 2195-224.
31. Hedges SR, Agace WW, Svanborg C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol*. 1995 Jul;3(7):266-70.
32. Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y., and Baeuerle, P.A. (1993) Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 365, 182-185.
33. Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of Toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and... nd sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol*. 168:4531–4537.

34. Huang, H., Calderon, T.M., Berman, J.W., Braunstein, V.L., Weiss, L.M., Wittner, M., and Tanowitz, H.B. (1999) Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression. *Infect Immun* 67, 5434-5440.
35. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997; 388, 190-195.
36. Ishii, M., Hogaboam, C.M., Joshi, A., Ito, T., Fong, D.J., and Kunkel, S.L. (2008) CC chemokine receptor 4 modulates Toll-like receptor 9-mediated innate immunity and signaling. *Eur J Immunol* 38, 2290-2302.
37. Janeway, C.A.Jr., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002; 20: 197-216
38. Karin, M., Delhase, M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*. 2000; 12(1):85-98.
39. Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmeler, M., Thome, M., Froelich, C.J., and Tschopp, J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*. 1998; 161, 3936-3942.
40. Kawai, T., Akira, S. TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*. 2006; 13, 816-825.
41. Kayama, H., Takeda, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes and Infection*. 2010;12:511-517.
42. Kleijn, D., Pasterkamp, G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Res*. 2003; 60: 58-67.

43. Kim, H., H. S. Lee, K. T. Chang, T. H. Ko, K. J. Baek, and N. S. Kwon. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor-kappa B. *J Immunol.* 1995;154:4741-8.
44. Lannes-Vieira, J., Araújo-Jorge, T.C., Soeiro, M.N.C., Gadelha, P., Corrêa-Oliveira, R. The Centennial of the discovery of Chagas disease: facing the current challenges. *PLoSntds.* 2010; 4(6): e645
45. Leite M.F., Moyer M.S., Andrews N.W. (1998) Expression of the mammalian calcium signaling response to *Trypanosoma cruzi* in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Biochem Parasitol* 92, 1-13.
46. Li X., Jiang S., Tapping R.I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine.* 2010; 49: 1–9.
47. Macedo, A.M., Pena, S.D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today.* 1998;14(3)119 -124.
48. Machado, F.S., Martins, G.A., Aliberti, J.C., Mestriner, F.L., Cunha, F.Q., and Silva, J.S. (2000) *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation* 102, 3003-3008.
49. Maganto-Garcia E, Punzon C, Terhorst C, Fresno. Rab5 activation by Toll-like receptor 2 is required for *Trypanosoma cruzi* internalization and replication in macrophages. *Traffic.* 2008,9(8):1299-315.
50. Moncayo, A., Silveira, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(Suppl.I):17–30

51. Monteon V. M. ,Furuzawa-Cabellada J. ,Alejandre-Aguilar R. ,Aranda-Fraustro A. ,Rosales-Encina J. L. Reyes P. A. American trypanosomiasis:in situ and generalized features of parasitism and infammation kinetics in a murine model. *Exp Parasitol* 1996;83:267±74.

52. Mukherjee S, Huang H, Petkova SB, Albanese C, Pestell RG, Braunstein VL, Christ GJ, Wittner M, Lisanti MP, Berman JW, Weiss LM, Tanowitz HB. Trypanosoma cruzi infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5274-82.

53. Nascimento F.H.F.,Abrahamsohn P.A. The inoculation site of Trypanosoma cruzi trypomastigotes in the dermis of normal, immune or Infected mice. The infammatory eaction. *Mem Inst OswaldoCruz*1987;82S:115.

54. Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, Neves FS, Cavalcanti GS, Boscardin S, Nunes MP, Santiago MF, Nóbrega A, Rodrigues MM, Bellio M. [Impaired innate immunity in Tlr4\(-/-\) mice but preserved CD8+ T cell responses against Trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice.](#) *PLoS Pathog*. 2010 Apr 29;6(4):e1000870.

55. O'Neil L,A.J. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunol*. 2006;18:3-9.

56. O'Neill, L.A.J., Bowie, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling .*Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 353–64

57. Palomino S.A., Aiello V.D., Higuchi M.L. (2000) Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and Trypanosoma cruzi antigens. *Ann Trop Med Parasitol*. 94:571-579.

58. Perkins, N.D. Integrating cell-signaling pathways with NF- κ B and IKK function. *Nat.Rev.Mol.CellBiol.*2007; 8: 49–62.

59. Petersen, C.A., Krumholz, K.A. Carmen, J., Sinai, A.P., and Burleigh, B.A. (2006) Trypanosoma cruzi Infection and Nuclear Factor Kappa B Activation Prevent Apoptosis in Cardiac Cells. *Infect Immun* 74, 1580-1587.

60. Prata, A. Chagas` Disease. *Infect. Dis. Clin. North America*, 1994; 8:61-75.

61. Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas` disease. *The Lancet*, 2001; 1: 92-100,

62. Rassi, A. Jr. Rassi, A., Little, W.C. Chagas heart disease. *Clin Cardiol.* 2000; 23: 883–89.

63. Reis D.D., Jones E.M., Tostes S. Jr., Lopes E.R., Gazzinelli G., Colley D.G., McCurley T.L. (1993) Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48(5):637-44.

64. Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J.E., and Galand, P. (1991) Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138, 447-453.

65. Rodriguez, A., Rioult, M.G., Ora, A., and Andrews, N.W. (1995) A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* 129, 1263-1273.

66. Rodríguez, A.; Samoff, E.; Rioult, M.G.; Chung, A.; Andrews, N.W. Host cell invasion by Trypanosomes requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. *J.Cell.Biol.* 1996; 134(2):349-362.

67. Ropert, C., Almeida, I.C., Closel, M., Travassos, L.R., Ferguson, M.A., Cohen, P., and Gazzinelli, R.T. (2001) Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 166, 3423-3431.

68. Ruiz. R.C., Favoreto Junior, Dorta, M.L., Oshiro, M.E.M., Ferreira, A.T, Manque, P.M., Yoshida, N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem. J.* 1998: 330:505-511.

69. Russo, M., Starobinas, N., Ribeiro-Dos-Santos, R., Minoprio, P., Eisen, H., and Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1989) Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 11, 385-395.

70. Schenkman S, Diaz C, Nussenzweig V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp Parasitol.* 1991 Jan;72(1):76-86.

71. Schuster JP, Schaub GA. *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *Int J Parasitol.* 2000 Dec;30(14):1475-9.

72. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, Heinrich M, Merkel O, Ehrenschwender M, Adam D, Mentlein R, Kabelitz D, Schütze S. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptorsomes as death signaling vesicles. *Immunity.* 2004 Sep;21(3):415-28.

73. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995 Jun;9(9):726-35.
74. Silva, J.S., Vespa, G.N., Cardoso, M.A., Aliberti, J.C., and Cunha, F.Q. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 63, 4862-4867.
75. Souza, W. O parasita e sua interação com os hospedeiros. In : Koogan, Guanabara. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: 2000. Cap. 7, p. 88-126.
76. Sun, D., and Ding, A. (2006). MyD88-mediated stabilization of interferon-gamma-induced cytokine and chemokine mRNA. *Nat Immunol* 7, 375-381.
77. Takada, H., Chen, N.J., Mirtsos, C., Suzuki, S., Suzuki, N., Wakeham, A., Mak, T.W., and Yeh, W.C. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol.* 2003; 23, 4026-4033.
78. Tanowitz, H.B.; Kirchhoff, L.V.; Simon, D.; Morris, S.A.; Weiss, L.M.; Wittner, M. Chagas` disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5: 400-419.
79. Tardieux, I.; Webster, P.; Ravesloot, J.; Boron, W.; Lunn, J.A.; Heuser, J.E.; Andrews, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell*, 1992; 71(7):1117-1130.
80. Tardieux, I., Nathanson, M.H., and Andrews, N.W. (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med* 179, 1017-1022.
81. Thommesen, L., and Laegreid, A. Distinct differences between TNF receptor 1- and TNF receptor 2-mediated activation of NFkappaB. *J Biochem Mol Biol.* 2005: 38, 281-289.

82. Titus, R.G., Sherry, B., Cerami, A: The involvement of TNF, IL-1, and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. *Immunol Today*. 1991; 12: A13-A16.

83. Truyens C, Torrico F, Angelo-Barrios A, Lucas R, Heremans H, De Baetselier P, Carlier Y. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. *Parasite Immunol*. 1995 Nov;17(11):561-8.

84. World Health Organization. Control of Chagas disease. World Health OrganTech Rep Ser. 2002.pp1–109

85. Yoshida, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc*. 2006; 78(1): 87-111.

86. Zhang, L., and Tarleton, R.L. (1999) Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis* 180, 480-486.