Tatiana Luna Gomes da Silva

Modulação da infecção chagásica experimental por neutrófilos

Dissertação submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando à obtenção do grau em mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Modulação da infecção chagásica experimental por neutrófilos

Tatiana Luna Gomes da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientação: Célio Geraldo Freire de Lima
Co- orientação : Marise Pinheiro Nunes

Rio de Janeiro
Julho/2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Luna, Tatiana Gomes da Silva
Modulação da infecção chagásica experimental por neutrófilos
Tatiana Luna Gomes da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/IBCCF,2007
XIII, .:...f .: 83 il.: 31 cm
Orientador: Célio Geraldo Freire de Lima
Co- orientadora: Marise Pinheiro Nunes
Dissertação (mestrado) – UFRJ, IBCCF, Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2007-07-01
Referencias bibliográficas : f.64-83

1. *Trypanosoma cruzi. 2.* neutrófilos. 3. macrófagos
   I. Freire de Lima C. G. ; Nunes M. P.
   II. Universidade Federal do Rio de Janeiro,Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
   III. Título

Este trabalho é dedicado com carinho aos meus pais pelo apoio, amor e por estarem ao meu lado a cada conquista. Sem vocês, este trabalho não seria realizado!

Agradecimentos

- Agradeço a Deus pela sua fidelidade, por me ajudar a tomar as decisões certas e por me conceder mais esta benção;
- Ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e ao programa de Imunobiologia pela oportunidade de fazer parte de um conceituado curso de pós-graduação;
- A capes pelo apoio financeiro;
- Agradeço ao meu orientador Célio Geraldo Freire de Lima, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pela amizade e por todo apoio durante o desenvolvimento desta tese;
- A minha co-orientadora Marise pelos ensinamentos ;
- A minha amiga Carla, pela amizade e por ter me ajudado sempre que eu precisei;
- Ao professor George dos Reis e a Dra. Flávia Ribeiro Gomes, pelas idéias e ensinamentos;
- A todos os meus amigos do laboratório de Biologia Imunitária, pelo carinho e pelos momentos de descontração que foram indispensáveis;
- Aos meus pais que são meus exemplos de vida, pelo investimento mesmo diante das dificuldades, por acreditarem em mim e por estarem ao meu lado até nos momentos de stress;
- Ao meu namorado pelo amor dedicado, pelo apoio, pela paciência e por me entender sempre;
- Agradeço também aos meus amigos e colaboradores que de forma direta ou indireta tornaram esse sonho possível.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

(Albert Einstein)

Resumo

Modulação da infecção chagásica experimental por neutrófilos

Tatiana Luna Gomes da Silva
Orientadores: Célio Geraldo Freire de Lima (IBCCF) e Marise Nunes (FIOCRUZ).
Resumo da dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da inflamação. Neste estudo, estudamos as conseqüências da interação de neutrófilos e macrófagos na infecção experimental por *T. cruzi* (Dm28c) *in vitro e in vivo*. Co-culturas de neutrófilos apoptóticos ou viáveis de camundongos BALB/c com macrófagos peritoneais infectados (BALB/c e C57BL/6) resultaram no aumento da replicação dos parasitas e na produção de IL-10, TGF-â e PGE_2. O tratamento com anti- TGF â e inibidor de COX bloqueou a replicação do parasita. Por outro lado, co-culturas de neutrófilos viáveis com macrófagos isolados de camundongos C57BL/6 resultaram na diminuição do número de parasitas na cultura e aumento da produção de TNF-á e NO. A adição de anticorpo neutralizante anti- TNF-á, PMSF, inibidor de elastase ou neutrófilos apoptóticos resultou na reversão do efeito microbicida do macrófago e no aumento da replicação parasitária. A adição de elastase em macrófagos infectados previne a replicação dos parasitas. A adição de um inibidor seletivo de iNOS previne a morte dos parasitas, sugerindo o papel do NO neste sistema. Nós também avaliamos o aumento da migração de neutrófilos e a produção de IL-10, TGF-â e PGE no exudato peritoneal de camundongos BALB/c infectados com *T. cruzi*. Nossos resultados mostraram que neutrófilos viáveis de camundongos C57BL/6, protegem contra replicação do parasita por um mecanismo TNF-á, elastase e NO dependente. Este mecanismo não depende de contato entre neutrófilos e macrófagos. Em adição, a susceptibilidade de camundongos BALB/c na infecção pelo *T. cruzi* é mediada pelo aumento do infiltrado de neutrófilos e a produção de IL-10, TGF-â e PGE_2.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*, neutrófilos e macrófagos.

Rio de Janeiro/2007

Abstract

Modulation of experimental *T. cruzi* infection by neutrophils

Tatiana Luna Gomes da Silva
Orientadores: Célio Geraldo Freire de Lima (IBCCF) e Marise Nunes (FIOCRUZ).
Resumo da dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Neutrophils are the first cells recruited to an inflammatory site. We studied the inflammatory consequences of macrophages/neutrophils in an experimental *T. cruzi* (Dm28c) infection. Co-culture of apoptotic neutrophils or viable neutrophils of BALB/c with infected peritoneal macrophages of either BALB/c or C57BL/6 resulted in the release of parasites, IL-10, TGF-β and PGE-2 production. Treatment with anti-TGF-β and a COX inhibitor blocked the parasite replication. In contrast, co-culture of viable neutrophils with macrophages isolated from C57BL/6 mice parasites and increased TNF-α production. The addition of anti-TNF-α, PMSF, Elastase inhibitor or apoptotic neutrophils restored parasite replication. The addition of Elastase in *T. cruzi* macrophages infected prevented parasites replication. The addition of iNOS inhibitor prevented the killing of parasites by infected C57BL/6 macrophages, suggesting a role for NO is our system. We also evaluated the increase neutrophil infiltration and production TGF-β, IL-10 and PGE-2 in the peritoneal exudates of *T. cruzi* infected BALB/c mice. Our results showed that viable neutrophils from C57BL/6 mice protect against parasite replication through a TNF-α, protease (Elastase) and NO-dependant mechanism. This mechanism is does not adepend of macrophages/neutrophils contact. Furthermore, the susceptibility of BALB/c mice to *T. cruzi* infection is mediated by increase neutrophil infiltration and TGF-β, IL-10 and PGE_2 production.

Key-Words: *Trypanosoma cruzi*, neutrophils and macrophages.

Rio de Janeiro/2007

Lista de abreviaturas

BHI – brain heart infusion
CD3 - complexo proteico não polimorfico associado ao TCR de células T
CD4 - cluster of differentiation antigen 4 (linfócito T auxiliar)
CD8 - cluster of differentiation antigen 8 (linfócito T citotóxico)
COX- Cicloxigenase
DMEM- Dulbecco's Modificated of Eagle Medium
DO- Densidade ótica
ELISA – (enzyme-linked immunosorbent assay)
FUNASA – Fundação nacional de saúde
h -hora
HBSS – solução salina balanceada de Hank's (Hank's balanced salt solution)
i.p. – intraperitoneal.
IFN- – interferon gama (interferon gamma)
IgG – imunoglobulina-G (immunoglobulin-G)
IL – interleucina (interleukin)
LPS – Lipopolissacarídeo (lipopolisacharide) proveniente de membrana de bactérias gram-positivas
NE- elastase neutrofílica
NETs – neutrophil extracelular traps
NO - Oxido nítrico
NSAID – Anti-inflamatório não esteroidais
ºC – graus Celsius
ODC - Ornitina descarboxilase
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAF – Fator ativador de plaquetas (Platelet-activating factor)
PBS – solução de fosfato tamponada (phosphate buffer saline)
PBS/BSA – solução de fosfato tamponada / albumina bovina sérica)
PGE2 – prostaglandina-E2 (prostaglandin- E2)
pH – concentração hidrogeniônica
PMN- polimorfonuclear/neutrófilos
PMSF- inibidor de protease – Phenylmethylsufonyl Fluoride
PS – fosfatidilserina
PSR - receptor de fosfatidilserina
TGF-β - transforming growth factor-β
TLR- recptores TOLL-LIKE
TNF-α - fator de crescimento tumoral - alfa (tumor necrosis factor alpha)
TNF-α R – Receptor fator de necrose tumoral - alfa (tumor necrosis factor alpha receptor)
TSP - trombospondina
VnR (CD51/CD61) - receptor de vitronectina
µg - micrograma
µl-microlitro

Índice de figuras

		Página
Figura 1	Figura1: distribuição geográfica da doença de Chagas	1
Figura 2	Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi*	3
Figura 3	Efeito de neutrófilos vivos e apoptóticos co-cultivados com macrófagos infectados com *T.cruzi*.	25
Figura 4	A adição de um inibidor de morte celular confirma a viabilidade dos neutrófilos de BALB/c	28
Figura 5	Interferência de neutrófilos apoptóticos sobre culturas de macrófagos infectados com *T.cruzi e* neutrófilos viáveis de C57BL/6	29
Figura 6	Produção de citocinas	30
Figura 7	Produção de citocinas	32
Figura 8	Envolvimento de prostaglandina E_2	34
Figura 9	Efeito de indometacina sobre co-culturas de macrófagos infectados com *T.cruzi* e neutrófilos de BALB/c	35
Figura 10	O efeito microbicida dos neutrófilos de C57BL/6 é dependente de NO	36
Figura 11	A atividade microbicida de macrófagos não depende de contato celular com neutrófilos de camundongos C57BL/6	40
Figura 12	Efeito da inoculação intraperitoneal do *T. cruzi* em duas linhagens de camundongos isogênicas (BALB/c e C57BL/6)	41
Figura 13	Análise dos tipos celulares presentes no lavado peritoneal nas duas linhagens de camundongos estudados (BALB/c e C57BL/6)	42
Figura 14	Foto-microscopia ótica do lavado peritoneal de linhagens isogênicas (BALB/c e C57BL/6 infectados com *T.cruzi*	43
Figura 15	Microscopia eletrônica de células obtidas do lavado peritoneal de camundongos BALB/c após 24 horas.	44

Figura 16 Quantificação de citocinas do fluido peritoneal dos camundongos de BALB/c e C57BL/6 infectados ou não após 24 horas. 46

Figura 17 Participação de proteases na ação moduladora dos neutrófilos de C57BL/6. 48

Figura 18 Elastase neutrofílica e o crescimento do *T. cruzi in vitro* 49

Figura 19 Ação imunomoduladora da elastase neutrofílica sobre a morfologia dos macrófagos 51

Sumário

Página

1.0 Introdução 1

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas 1

1.2 Os neutrófilos e a resposta imune inata 8

1.3 Neutrófilos e doenças infecciosas 11

1.4 Apoptose e parasitas 12

2.0 Objetivos 16

3.0 Materiais e métodos 17

3.1 Parasitas 17

3.2 Animais 17

3.3 Obtenção de macrófagos peritoneais murinos 18

3.4 Infecção dos macrófagos peritoneais com *T. cruzi* 18

3.5 Obtenção de neutrófilos viáveis ou apoptóticos e co-cultivo com macrófagos 19

3.6 Anticorpos , citocinas e inibidores 19

3.7 Avaliação de efeito dependente de contato celular (Transwell) 20

3.8 Dosagem de citocinas 20

3.9 Avaliação de óxido nítrico 21

3.10 Dosagem de PGE_2 (Análise de imuno absorção por ligação enzimática (EIA)). 21

3.11 Western blotting 22

3.12 Microscopias 23

3.13 Contagem total e diferencial das células do lavado peritoneal 24

3.14 Análise estatística 24

4.0 Resultados 25

4.1 Efeito de neutrófilos vivos ou apoptóticos sobre culturas de macrófagos infectados com *T. cruzi.* 25

4.2 A adição de um inibidor de morte celular confirma a viabilidade dos neutrófilos de BALB/c 28

4.3 Ação imunomoduladora das células apoptóticas sobre o efeito microbicida dos macrófagos estimulados com os neutrófilos de C57BL/6 29

4.4 Detecção de citocinas no sobrenadante de co-culturas de macrófagos infectados 30

4.5 Participação de citocinas na modulação da infecção 32

4.6 Envolvimento de prostaglandina E_2 34

4.7 Efeito da inibição de prostaglandinas sobre co-culturas de macrófagos infectados com *T.cruzi* e neutrófilos 35

4.8 O efeito microbicida dos neutrófilos de C57BL/6 é dependente de NO. 36

4.9 O efeito microbicida dos neutrófilos de C57BL/6 não depende de contato celular. 40

4.10 Efeito da inoculação intraperitoneal do *T. cruzi* em duas linhagens de camundongos isogênicos 41

4.11 Análise dos tipos celulares presentes no lavado peritoneal nas duas linhagens de camundongos estudados 42

4.12 Microscopia óptica do lavado peritoneal das duas linhagem isogênicas de camundongos infectados com *T. cruzi*. 43

4.13 Microscopia eletrônica de células obtidas do lavado peritoneal de camundongos BALB/c 44

4.14 Citocinas do lavado peritoneal após 24 horas 46

4.15 Participação de proteases na ação moduladora dos neutrófilos de C57BL/6 48

4.16 Elastase neutrofílica e o crescimento do *T. cruzi in vitro.* 49
4.17 Ação imunomoduladora da elastase neutrofílica sobre a morfologia dos macrófagos. 52

5.0 Discussão 54

6.0 Conclusão 63

7.0 Referências Bibliográficas 64

Introdução

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Em 1909, Carlos Chagas observou ao microscópio um flagelado que denominou *Schizotrypanun* identificando-o como o agente etiológico de uma nova doença, a Tripanosomíase Americana ou doença de Chagas. Além disso, Carlos Chagas também descreveu seu ciclo de vida, o vetor, o reservatório silvestre assim como a patologia causada por este parasita. (Chagas, 1924).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e a família Tripanosomatidae (Rey, 2000). Esta doença tem caráter endêmico na América Latina (Fig 1) e estima-se que 13 milhões de pessoas estejam infectadas e cerca de 100 milhões estejam expostas ao risco de infecção (WHO, 2005).No Brasil a incidência anual é de 200.000 novos casos e de 3 a 5 milhões de infectados onde, 50 mil morrem a cada ano (FUNASA, 2006).

Figura1: distribuição geográfica da doença de Chagas (WHO, 1996)

O *T. cruzi* é transmitido por diversas espécies de Triatomíneos, insetos hematófagos pertencentes à família Reduviidae que, no momento do repasto sanguíneo, eliminam juntamente com as fezes as formas tripomastigotas metacíclicas que são altamente infectivas para os vertebrados. A transmissão também pode ocorrer por transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita, pela ingestão de alimentos infectados ou por acidentes laboratoriais (Prata *et al*., 1994) .

O *T. cruzi* é um parasita capaz de infectar diferentes tipos celulares no hospedeiro mamífero, apresentando um tropismo por células do sistema fagocítico mononuclear e células musculares, principalmente músculos cardíaco e liso (Brener *et. al*., 2000; Tyler & Engman, 2001). Logo após o processo de infecção, as formas tripomastigotas permanecem no vacúolo parasitóforo até que ocorra a formação do fagolisossoma, sua lise e a chegada ao citoplasma. No citoplasma, os tripomastigotas diferenciam-se em formas amastigotas e se multiplicam por fissão binária no interior das células. Ao atingir certa densidade, as amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas que rompem as células parasitadas, podendo infectar outras células vizinhas e se propagar a outros tecidos e órgãos do hospedeiro por via hematogênica e/ou linfática. O inseto vetor ao sugar o sangue de um vertebrado infectado, ingere tripomastigotas sanguíneos, que no inseto encontram condições favoráveis para diferenciar-se em epimastigotas, que são formas de multiplicação ativa. Os epimastigotas migram para o intestino posterior do inseto Triatomíneo onde se transformam em tripomastigotas com capacidade infectiva. Por serem as formas finais do ciclo no inseto, são conhecidos como tripomastigotas metacíclicos (Fig 2) (Brener *et. al.,* 2000; Tyler & Engman, 2001).

Figura 2: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (www.fiocruz.br, 2007)

Os tripomastigotas metacíclicos infectam células e causam uma intensa inflamação local. Se a infecção for localizada na órbita ocular, ocorre a formação de um edema inflamatório conhecido como sinal de Romana ; se acontecer na pele provoca uma intensa resposta inflamatória chamada Chagoma (Romaña, 1943; Bijosvsky & Milder, 1988; Andrade, 1991). O processo inflamatório persiste por cerca de 40 dias e aparece quando , além da picada, ocorre a inoculação do parasita.

A reação inflamatória tem um papel fundamental na patogenia da doença e desencadeia focos necróticos após a ruptura das células infectadas. Quando a infecção não se sucede de óbito, todo o processo inflamatório regredirá progressivamente, em paralelo com a diminuição da parasitemia e com o aumento da concentração de anticorpos (Brener *et. al.,* 2000).

As formas da doença, aguda e crônica, são muito variáveis. São fatores de grande risco: a baixa idade e a imunossupressão. A infecção aguda aparece 8-10 dias após o contágio, dura de alguns dias até 8 semanas, e extingue-se espontaneamente. Começa com febre alta, contínua (2 a 5 dias), dores generalizadas, fígado, baço e gânglios linfáticos (ínguas) aumentados; taquicardia, miocardite, e outros sintomas. O chagoma, inchaço na pele em qualquer lugar do corpo, e o sinal de Romaña, inchaço em um dos olhos, que indicam o ponto de entrada do parasita, selam o diagnóstico. Note-se, porém, que podem faltar alguns ou todos os sintomas: o indivíduo pode não ter nenhuma suspeita de ter-se infectado. Na fase aguda são destruídos os gânglios parassimpáticos que controlam parte da atividade do coração e do aparelho digestivo. A extensão dessas lesões irreversíveis depende da carga parasitária, do estado do paciente e de outros fatores, e determina o curso da doença. As formas nervosas, aguda e crônica, são mais raras (www.saude.gov.br).

Quando devidamente tratado, o paciente com doença de Chagas pode curar-se em proporções que variam entre 30 e 90% (Andrade, 1991).

A prevenção consiste em manter a moradia livre do barbeiro; proteger alimentos que deixem qualquer dúvida sobre sua possível contaminação (www.saude.gov.br).

A resposta imune na Doença de Chagas é extremamente ampla e vem sendo pouco investigada. Resumidamente, é constituída de hipersensibilidade celular no sítio de entrada e de reação inespecífica inicial, através de macrófagos e neutrófilos. (Andrade, 2000). A formação de anticorpos específicos da classe IgM é relativamente precoce, iniciando-se ao fim da primeira semana e mantendo níveis altos durante toda a fase aguda, o que pode ajudar no diagnóstico. A nível celular, a infecção pelo *T. cruzi* resulta basicamente em ativação policlonal linfocitária. A invasão de macrófagos do hospedeiro por tripomastigotas inicia a resposta inata pelo recrutamento e ativação de células NK e linfócitos T, envolvendo a secreção de interleucina 12 e fator de necrose tumoral pelos macrófagos. Já as células NK atuam sobre os macrófagos, induzindo a produção de Óxido Nítrico e a eliminação de formas intracelulares do parasito (Andrade, 2000). Experimentalmente, animais com deficiência na maturação de linfócitos T e B desenvolvem a imunidade inata, mas não a adquirida. Por sua vez, animais deficientes em linfócitos T CD4 e T CD8 serão muito mais suscetíveis à infecção pelo *T.cruzi,* apresentando alta mortalidade e parasitemia (Andrade, 2000).

A resposta imune ao *T. cruzi* e os mecanismos de injúria cardíaca tem sido bem demonstrados (Dos Reis *et. al.,* 2005). A infecção pelo *T.cruzi* é difícil de ser eliminada pelo sistema imune. O parasita persiste em dependência de diversos fatores, como: aumento de moléculas que induzem supressão de células T , a ativação policlonal de linfócitos e a apoptose de células do hospedeiro (Dos Reis *et al*, 2005).

A ativação e diferenciação de células TCD4+ e TDC8+ efetoras é requerida para o controle da infecção. Células dendríticas possuem um papel central na resposta imune, capturando e apresentando antígenos para células T naive. Mas, a infecção pelo *T.cruzi* produz uma mistura de respostas "T Helper" (Th1/Th2) e é, o balanço Th1/Th2 que determina a resistência ou susceptibilidade (Dos Reis *et al*, 2005).

Martins e colaboradores demonstraram que, bloqueando o CTLA-4 (que é um receptor de alta afinidade para moléculas B7 presentes em células T) com anticorpo específico, há um aumento da produção de IFN- e NO por esplenócitos e aumento da resistência a infecção pelo *T.cruzi* (Martins *et al.,* 2004). Assim, a a co-estimulação pelo CTLA-4 inibe a resposta imune ao *T. cruzi* e a ativação convencional de células T (Salomon *et al.,* 2001).

O *T.cruzi* expressa diferentes moléculas que funcionam como ligantes de TLR (Toll like receptor). Os receptores do tipo TLR são receptores transmenbrana conservados evolutivamente que atuam como receptores de sinalização. Estes estão presentes em fagócitos do sistema imune inato. A mucina GPI-ancorada ativa macrófagos, via TLR-2 (Campos *et al*., 2001), GIPLs interagem com TLR-4 (Oliveira , 2004) e DNA como ligante para TLR-9 (Shoda, *et al*., 2001).

Durante este trabalho tivemos a oportunidade de estudar duas linhagens de camundongos isogênicos, Balb/c e C57Bl/6, e avaliar o envolvimento dos neutrófilos na infecção chagásica experimental, acarretada por uma cepa monoclonal de *T cruzi* (DM28C), que é uma cepa amplamente utilizada para estudos imunológicos por ter um perfil conhecido e não apresentar mortalidade.

Camundongos de linhagens isogênicas vêm sendo utilizados como excelentes modelos para o estudo da doença de Chagas experimental, pois, esses animais apresentam parasitemia e desenvolvem lesões teciduais bem definidas, como a miocardite. O modelo murino da infecção pelo *T cruzi* tem sido utilizado com as mais diversas finalidades e, a principal preocupação é caracterizar os fatores que podem influenciar o curso da infecção (Roggero et al.; 2002) .

Diferentes camundongos desenvolvem uma infecção que varia de acordo com a cepa do parasita, o inóculo, a idade e a resistência, tanto natural quanto adquirida pelo animal . Um grupo estudou a susceptibilidade de camundongos de diferentes linhagens isogênicas à infecção pelo *T.cruzi* .Nesses estudos observaram que camundongos C3H/He apresentaram maior susceptibilidade, os camundongos Balb/c média susceptibilidade e os camundongos C57Bl/6 apresentam baixa susceptibilidade. Atualmente sabe-se que o perfil susceptibilidade/resistência na infecção experimental pelo T.cruzi pode variar em uma mesma linhagem de camundongos e isso dependerá da cepa do parasita que o animal fora infectado. Alguns autores têm demonstrado que as diferentes linhagens, são equivalentemente susceptíveis para a cepa peruana, com o C57Bl/6 mais resistente para cepa colombiana (Andrade et al.; 1985). Porém, trabalhos recentes indicam uma maior susceptibilidade do C57Bl/6 para a cepa Tulahuén (Silva et al.; 1992). É importante

ressaltar que o curso da infecção dependerá de fatores genéticos do parasita e do próprio hospeiro; ainda podemos incluir fatores imunológicos (Abel & Dessein, 1997).

1.2 Os neutrófilos e a resposta imune inata

Os neutrófilos são células do sistema imune inato e compõem mais de 60 % dos leucócitos da circulação e mais de 90% dos fagócitos circulantes. Essas células são as primeiras a chegar ao sítio da infecção, sendo consideradas componentes essenciais do sistema imune inato (Yamamoto & Sasada, 1999).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e à medida que a célula amadurece há redução na dimensão do núcleo com aumento da condensação da cromatina acompanhada de modificações da forma celular. Também ocorrem modificações nas granulações citoplasmáticas e variações na expressão de receptores da superfície celular. O processo de proliferação e diferenciação leva aproximadamente 14 dias, sendo produzidas, em média, 10^5 a 10^{11} células por dia. Na circulação, os neutrófilos têm uma vida média curta, de 6 a 10 horas, após esse período, os neutrófilos sofrem apoptose espontânea (Ley, 2002).

Apesar de sua rápida renovação, o número de neutrófilos humanos é relativamente estável, entre 30.000 a 40.000 neutrófilos/mm^3 de sangue total (Ley, 2002).

Quando os neutrófilos encontram com um patógeno, ocorre a ativação dos seus mecanismos microbicidas dependentes ou não de oxigênio. Os fagossomos dos neutrófilos adquirem atividade microbicida através da fusão com vesículas e grânulos secretórios, que

contém um arsenal poderoso e diversificado de enzimas proteolíticas, peptídeos microbicidas, assim como proteínas ligadas à membrana (Faurschou & Borregaard, 2003).

São conhecidas quatro categorias de grânulos neutrofílicos: 1. Grânulo primário ou azurofílico: contém enzimas como mieloperoxidase (MPO), á – defensinas, proteína ligada a membrana (CD63) e serino proteases. A MPO reage com o peróxido de hidrogênio induzindo a formação do ácido hipocloroso que ataca a membrana do patógeno. As á – defensinas são as maiores constituintes deste grânulo. Têm atividade microbicida contra bactérias, fungos, vírus envelopados e protozoários por formarem poros na membrana desses microorganismos. Além disso, induzem quimiotaxia para células T e monócitos, o que amplifica a resposta inflamatória, gerando uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Já as serino proteases, como a proteína G, catepsina e elastase, têm atividade proteolítica contra uma variedade de componentes da matriz extracelular, ativação de células endoteliais, epiteliais, macrófagos, linfócitos e plaquetas (Faurschou & Borregaard, 2003). A elastase neutrofílica é importante na estimulação de macrófagos para produção de citocinas, visto que, o lisado de neutrófilos induz secreção de TNF-á pelos macrófagos e que a adição de anticorpo anti-elastase inibe esta secreção (Fadok et al., 2001); 2. Grânulo secundário ou específico: contém substâncias como a lactoferrina, que apresenta atividade contra muitas bactérias Gram-positivas e negativas, pois impede seu crescimento pelo seqüestro de ferro (Faurschou & Borregaard, 2003); 3. Grânulos Terciários ou gelatinosos : contém gelatinases que tem a função de degradar a matriz extracelular durante o extravasamento e diapedese (Faurschou & Borregaard, 2003). 4. Vesículas secretórias: contém uma reserva de receptores associados à membrana , como $â_2$ – integrina, CR1,

receptor-fLMP, FCãIIIR, CD14 , que são necessárias para as fases iniciais da resposta inflamatória (Faurschou & Borregaard, 2003).

Em adição as atividades intracelulares das serino proteases neutrofílicas, estas livres, na forma de NETs (neutrophil extracelular traps), se ligam a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Estes NETs permitem que neutrófilos liberem altas concentrações de serino proteases, que degradam fatores de virulência e matam bactérias extracelulares (Nathan, 2006).

Além da atividade microbicida dos grânulos secretores, os neutrófilos quando ativados geram sinais quimiotáticos que atraem monócitos, células dendríticas, linfócitos, e atuam sobre os macrófagos para predominância do estágio pro- ou antiinflamatório (Nathan, 2006) .

Durante a fagocitose, os neutrófilos liberam uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o íon superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO). A ligação de vários agonistas a seus receptores específicos aciona uma cascata que ativa a enzima NAPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfati-oxidase), que oxida o NADPH e, neste processo, reduz o oxigênio em íon superóxido e em seguida , o superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (Nathan, 2006).

1.3 Neutrófilos e doenças infecciosas

Quando ativados os neutrófilos, apresentam modificações na produção de citocinas, quimiocinas e na expressão de moléculas de superfície. O tratamento de neutrófilos com IFN- diminui a secreção de IL-8 e aumenta a de TNF-á e IL-1â, diminuindo a produção de quimiocinas recrutadoras de neutrófilos e aumentando a secreção de citocinas que finalizam a resposta inflamatória (Ellis & Beaman, 2004).

Neutrófilos estimulados *in vitro* com LPS, IL-12 e TNF-á secretam pouco IFN- . Entretanto, experimentos *in vivo* demonstraram a secreção de IFN- pelos neutrófilos induzida por uma série de patógenos como *Nocardia asteróides, Salmonella tryphimurium, Leishmania major e Plasmodium berghei* (Ellis & Beaman, 2004).

A fagocitose de *Shiguella flexneri* pelos neutrófilos ativa defesas independentes de oxigênio. Ao ser fagocitada, a bactéria é destruída pela ação da elastase neutrofílica derivada dos grânulos azurofílicos. A *Legionella pneumophila* é morta pela ação oxidante dirigida pela mieloperoxidase, enquanto que o fungo *Histoplasma capsulatum* é destruído por mecanismos que dependem de substancias como catepsina G e á-defensinas (Allen *et al*,2003).

TNF-á é capaz de induzir a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) em macrófagos, o que é importante no controle inicial da infecção causada pela *Leishmania major* em camundongos C57BL/6 (Fonseca *et al*, 2003).

Neutrófilos também contribuem para o desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*, onde a depleção dos neutrófilos

foi suficiente para inibir o desenvolvimento de uma resposta TH2 (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000).

Co-culturas de neutrófilos exarcebam o crescimento de *Leishmania major* em macrófagos infectados da linhagem BALB/c; este mecanismo requer a produção de PGE_2 e TGF-â por macrófagos. Entretanto co-culturas de macrófagos infectados com neutrófilos de camundongos da linhagem C57BL/6 inibem a replicação do parasito por um mecanismo dependente da produção de elastase neutrofílica e TNF-á (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004).

A depleção de neutrófilos diminui os níveis de IFN-ã, IL-12, TNF-á e de IL-10, aumentando a lesão causada pelo *Toxoplasma gondii*. Estes dados mostraram a importância doa neutrófilos para a resposta imune e controle da replicação de taquizoítas (Susan *et. al.*, 2001)

No modelo de infecção chagásica experimental a depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c infectados resulta na exacerbação da parasitemia e redução da sobrevivência. Por outro lado, a depleção de neutrófilos em C57BL/6 aumenta a resistência e sobrevida desses animais (Chen *et al.*, 2001).

1.4 Apoptose e parasitas

A apoptose é um processo intensamente controlado de morte celular, que tem importantes implicações no desenvolvimento e homeostasia de vários tecidos, na defesa do hospedeiro contra vários patógenos e na regulação da resposta imune (Leonardo *et al*,1999 ; Krammer, 2000; Savill & Fadok, 2000).

Na apoptose, a célula retrai o citoplasma e a cromatina se agrega e condensa, formando o núcleo picnótico. A membrana plasmática permanece íntegra e as organelas bem preservadas. Mais tardiamente, a célula pode se fragmentar, originando os corpos apoptóticos (Srasses *et al*., 2000).

A sinalização para a apoptose pode ser deflagrada por diversos estímulos: via ligação com receptores de morte (Fas, TNFR e TRAIL), por estresse celular e por mecanismos dependentes da mitocôndria (Adriano *et al,* 2005). Entretanto essas vias convergem para uma maquinaria de morte comum, com a ativação da enzima efetora neste processo, a caspase-3 (Hengartner, 2000).

As caspases são enzimas da família das cisteínas proteinases e recebem esse nome por sua capacidade de reconhecer e clivar seletivamente resíduos de ácido aspártico (Thornberry *et al.,* 1997). Dados indicam a existência de um controle celular genético para morte programada (Hengartner & Horvitz, 1994). Em humanos, o gene bcl-2 foi o primeiro a ser descrito a partir de estudos em linfomas de célula B (Tsujimoto *et al.,*1985). Esse gene é capaz de inibir a morte celular mediada pelo receptor Fas/APO-1(CD95) e pelo TNF-α em algumas linhagens celulares (Armstrong *et al.,*1996).

A apoptose constitutivo de neutrófilos envolve a cascata proteolítica de caspases, como por exemplo, caspase 3 mediadas por ativação da proteína Kinase-δ (Pongracz *et al.,* 1999). Mediadores inflamatórios tais como LPS e GM-CSF retardam a apoptose de neutrófilos por aumentarem a estabilidade mitocondrial e reduzirem a atividade da caspase 3 (Watson *et al.,* 1999), e também por reduzirem a expressão de genes Bax, um membro pró-apoptótico da família dos Bcl-2 (Dibbert *et al.,* 1999). Em contraste, citocinas

antiinflamatórias, tais como IL-10, aceleram a apoptose de neutrófilos ativados por LPS (Cox, 1996).

A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos humanos induz mecanismos antiinflamatórios e supressores, associados a produção de TGF-â, prostaglandinas, arginase e PAF (Fadok *et al*., 1998; Freire-de-Lima et al, 2000, Freire-de-Lima *et al*, 2006).

Trabalhos vêm mostrando que, algumas bactérias patogênicas usam a apoptose em macrófagos do hospedeiro como um mecanismo de virulência (Zychlinsky & Sansonetti, 1997). Essa morte pode ser mediada pela produção de fatores tóxicos provenientes das bactérias, que são liberados pela ingestão do microorganismo, como visto nos estudos em que se utilizaram *Corynebacterium diphtheriae* (Kochi & Collier, 1993) e *Bacillus anthracis* (Hana et al., 1993).

Mecanismos supressores induzidos pela fagocitose de células apoptóticas por fagócitos têm sido sugeridos como estratégias de escape para alguns patógenos intracelulares (Lopes et al., 2000). A infecção por *T. cruzi* produz uma intensa morte celular induzida por ativação (Activation-Induced Cell Death/ AICD) de linfócitos T CD4+ (Lopes *et al*., 1995). O ambiente supressor gerado pela fagocitose de células apoptóticas induz a proliferação dos patógenos nas células do hospedeiro, como acontece com *Coxiella burnetti* (Zamboni *et al*., 2003), HIV (Lima *et al*., 2002) e *Leishmania major* (Ribeiro-Gomes *et al.,* 2004).

Este mecanismo de supressão também foi observado utilizando o modelo de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, onde foi demonstrado que a interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos infectados pelo *T.cruzi in vitro e in vivo* resultava no aumento

da carga parasitária pela produção e ação de mediadores antiinflamatórios como TGF- â e PGE_2 , induzindo um aumento na produção de poliaminas e favorecendo a permanência do parasita no hospedeiro Freire-de-Lima *et al.,* 2000).

Recentemente foi demonstrado que a *Leishmania major* retarda, mas não impede a apoptose espontânea dos neutrófilos (Aga *et al.,* 2002). Também foi demonstrado que a Leishmania sobrevive no interior do neutrófilo sob forma de promastigota sendo este neutrófilo infectado, capaz de secretar MIP-1 â, recrutando assim monócitos para o sítio de infecção (Zandbergen *et al.,* 2004). Desta maneira os macrófagos poderiam mais tarde fagocitar o neutrófilo infectado sem desencadear suas atividades de defesa contra o parasita. Este mecanismo foi denominado por Laskay e colaboradores como "Cavalo de Tróia" (Laskay *et al*., 2003).

O papel dos neutrófilos na imunorregulação da doença de Chagas ainda está sendo investigado. Evidências sugerem que os neutrófilos podem contribuir significativamente na modulação da resposta imune, tanto celular quanto humoral (Hoft *et al*., 1993). No presente trabalho, estudamos o papel de neutrófilos no curso da infecção chagásica experimental visto que, a utilização de infecção murina experimental tem contribuído muito para a melhor compreensão da interação *T. cruzi* e o sistema imune.

Objetivos

Objetivo geral

Esta dissertação teve como objetivo avaliar a participação de neutrófilos e da fagocitose dessas células no curso da infecção chagásica experimental através de estudos *in vitro e in vivo.*

Objetivos específicos

1. Avaliar a conseqüência da interação de neutrófilos com macrófagos infectados pelo *T. cruzi* sobre a replicação dos parasitas *in vitro;*

2. Relacionar quais os produtos liberados por neutrófilos com a susceptibilidade e resistência a infecção *in vitro e in vivo*;

3. Avaliar a interferência da apoptose de neutrófilos no mecanismo microbicida de macrófagos e;

4. Analisar o efeito da adição exógena de elastase neutrofílica em culturas de macrófagos murinos infectados.

Materiais & Métodos

1. Parasitas

Formas epimastigotas do clone Dm28 c do *T. cruzi* foram mantidas em meio "Brain Heart Infusion" (BHI - Difco/Becton & Dickinson Laboratories, Detroit, USA) suplementado de Hemina (25 mg/L), ácido fólico (20 mg/L) (ambos da Sigma Chemical Co.) e 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco - Invitrogen) em estufa BOD a 28^0 C. As formas metacíclicas, foram induzidas quimicamente em meio TAU-P "Artificial Triatomine Urine" (190mM NaCl; 8 mM de tampão fosfato de sódio, pH 6,0; 17 mM KCl; 2 mM $CaCl_2$; 2 mM $MgCl_2$; 0,035% de $NaHCO_3$, com adição de 10 mM de L-prolina; Sigma Chemical Co.) e diferenciadas *in vitro.*

2. Animais

Os animais utilizados nesse estudo foram machos de duas linhagens isogênicas, BALB/c e C57BL/6, com seis a oito semanas de idade, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As experiências foram realizadas de acordo com as normas para utilização de animais de laboratório estabelecidas pela Comissão de Ética da IBCCF/UFRJ.

3. Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos murinos residentes foram obtidos a partir da "lavagem" da cavidade peritoneal de camundongos normais com 5 ml de meio Dulbecco's Modificated of Eagle Médium DMEM (Gibco-Invitrogen) sem soro. As células foram contadas em câmara dee Neubauer com a utilização de azul de Trypan e ajustadas na concentração de $4x10^5$ céls/ml em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, 500 µl dessa suspensão foi distribuída em triplicatas em placas de 48 poços (TPP-Switzerland). As culturas foram incubadas por 4 h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 para aderência das células ao plástico.

4. Infecção dos macrófagos

Os macrófagos, obtidos como descrito acima, foram infectados com formas tripomastigotas metacíclicas diferenciadas *in vitro* do *Trypanosoma cruzi* na proporção parasita:célula de 3:1 em meio DMEM e incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Após incubação *overnight* (ON) com os parasitas, os macrófagos foram lavados exaustivamente com Hanks' sem soro (Gibco-Invitrogen) para remoção dos parasitas extracelulares.

5. Obtenção de neutrófilos viáveis ou apoptóticos e co-cultivo com macrófagos

Para realização das co-culturas de neutrófilos e macrófagos infectados como descrito nos itens 3 e 4, neutrófilos foram obtidos a partir da lavagem da cavidade peritoneal de animais que receberam a injeção de 1 mL de Tioglicolato de sódio 3% 7 horas antes (Sigma Chemical Co., MO). As células obtidas foram lavadas e incubadas em meio DMEM (Sigma Chemical Co., MO) por 1h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2, em garrafas plásticas para cultura de células (Corning) para remover macrófagos aderentes. As células não aderentes (80-90% de neutrófilos) foram lavadas e utilizadas logo em seguida. A indução de apoptose foi realizada incubando-se os neutrófilos ON em meio DMEM sem SFB a 37°C em atmosfera úmida contendo de 5% de CO_2 . Neutrófilos viáveis ou apoptóticos foram adicionados aos macrófagos infectados e às culturas foram submetidas a diferentes estímulos como indicados nas legendas das figuras. Decorridos 7 dias de cultura, o número de tripomastigotas foi avaliado com auxílio de câmaras de Neubauer.

6. Anticorpos, citocinas e inibidores.

Foram adicionados também nas co-culturas anti- TNF-á (10 μg/ml) , anti- TGF –â, (10 μg/ml), Indometacina (10 μg/ml), L-Nil (inibidor da oxido nítrico sintase) (10

µM/poço), PMSF (inibidor de proteases) (0.1mM/poço) , Elastase neutrofílica (0,2 µg/ml) e Z-VAD (1µM) e seus efeitos foram avaliados.

7. Avaliação de efeito dependente de contato celular (Transwell)

Macrófagos peritoneais murinos infectados das linhagens C57BL/6 foram incubados com neutrófilos viáveis com a interferência de membranas que impossibilitam o contato celular (Millicell® Culture Plate Inserts 0,22 µm), o número de tripomastigotas liberados foi contado após 7 dias de cultura em câmaras de Neubaer.

8. Dosagem de citocinas

As concentrações de citocinas nos sobrenadante das co-culturas de macrófagos infectados e neutrófilos viáveis ou apoptóticos foram quantificadas após 24 horas de incubação através do método imunoenzimático do tipo sanduíche (ELISA), de acordo com metodologia preconizada pelo fabricante (R&D). Os sobrenadantes foram centrifugados para eliminar restos celulares e mantidos a –20º C até sua utilização. Placas para ELISA (Corning Costar) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura anti-TNFá (2 µg/mL); anti-TGF-â (3 µg/mL) ; anti-IL-10 (4 µg/mL); e incubadas a 4°C ON. Após esta etapa as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) (Sigma), e bloqueadas com PBS + 10% de SFB ou BSA por 2 horas a temperatura ambiente, seguida de nova etapa de lavagem com PBS-T. Os sobrenadantes, bem como as citocinas

recombinantes (curva-padrão) foram adicionados e incubados a 4°C ON. Após nova lavagem com PBS-T, foram adicionados anticorpos secundários biotinilados de anti-TNFá

(2 µg/mL); anti-TGF-â (3 µg/mL) ; anti-IL-10 (4 µg/mL)e incubados a temperatura ambiente por 3 horas. A reação foi revelada com fosfatase alcalina conjugada à estreptoavidina (Southem Biotecnology Associates INC. Biminghm, AL), diluída na proporção de 1:2000 em PBS + 10 % SFB ou BSA, seguida de incubação a 37°C por 1 hora. Após etapa de lavagem, foi adicionado o substrato paranitrofenol fosfato (PNPP - Zymed) diluído em tampão Tris $MgCl_2$. A densidade óptica foi obtida através de leitura em espectrofotômetro de placa ($VERSA_{MAX}$ Microplate Reader Molecular Devices, USA), com filtro de 405 nm. As concentrações das citocinas foram calculadas a partir de uma curva padrão de citocinas recombinantes.

9. Avaliação de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) produzido pelos macrófagos peritoneais, co-cultivados ou não com os neutrófilos, foi quantificado pela presença de nitrito acumulada no sobrenadante das culturas usando o método colorimétrico de Griess descrito por Stuehr & Nathan (1989), onde 50 µl do sobrenadante da cultura foi adicionado a 50 µl do reagente de Griess em placas de 96 poços e a absorbância lida em espectrofotômetro de placa ($VERSA_{MAX}$ Microplate Reader Molecular Devices, USA), com filtro de 540 nm.

10. Dosagem de PGE_2 (Análise de imuno absorção por ligação enzimática (EIA)

Placas para ELISA foram sensibilizadas com 200 µl de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo diluído em tampão fosfato de potássio a 0,05 M e incubadas ON a temperatura ambiente. Após esta etapa as ligações inespecíficas foram bloqueadas com a adição de 200 µl de tampão fosfato de potássio 0,05 M contendo 3% de BSA, e a placa foi mantida sob agitação por 4 horas. Ápós esse período a placa foi lavada com tampão fosfato de potássio contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, foram adicionados 50 µl das amostras ou de prostaglandina E_2 da curva padrão. O anticorpo anti prostaglandina E_2 conjugada a colinesterase (50 µl) foi adicionado e incubado durante cerca de 16 horas. Após esta etapa, a placa foi lavada (5x) com Tween 20 a 0,05% em PBS. Em seguida foram adicionados 200 µl do reagente de Elman para revelar a reação. A placa foi mantida sob agitação durante 2 horas e a reação colorimétrica foi analisada em espectofotometro de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com o programa Soft Max Pro, e a dosagem baseada na curva padrão (Cayman Chemical, Amn Anbor, MZ).

11. Western blotting

As co-culturas de macrófagos e neutrófilos foram lavadas com PBS e aos macrófagos infectados, foram adicionados 80 µl de tampão de lise (Gibco BRL). Após 5 minutos as proteínas foram coletadas e submetidas à centrifugação por 20 minutos a 7.000 g. O sobrenadante da centrifugação foi coletado e 20 µl de tampão de amostra foram adicionados a este. Após esta etapa o material coletado foi aquecido por 5 minutos a 100 ^{0}C. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para membranas de nitocelulose em um sistema de blotting (BIO-RAD, Hercules, CA) por 30 minutos/30 v. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (TBS 5% BSA) por

1 hora a temperatura ambiente e incubada com anticorpo primário (anti-iNOS - Cayman Chemical Company) overnight a 4^0 C. Posteriormente, a membrana foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem (TBS 0,1% Tween 20) e incubada com o anticorpo secundário por 1 hora a temperatura ambiente (anti—IgG de coelho marcado com peroxidase– Cayman Chemical Company). As bandas foram reveladas utilizando o kit ECL Plus Western Blotting detection system (Armersham Biosciences).

12. Microscopias

12.1 Microscopia ótica

Macrófagos peritoneais murinos de camundongos C57BL/6 e BALB/c normais foram obtidos e distribuídos em placas de 24 poços . Essas células , foram incubadas com 0,2 mg/ml de elastase neutrofílica (CALBIOCHEM) por 24 horas . Após esse período as culturas foram fotografadas em microscópio de campo claro invertido.

12.2 Microscopia eletrônica

As células do exudato peritoneal de camundongos BALB/c após 24 de infecção pelo *T. cruzi,* foram obtidas por centrifugação, lavadas em PBS (3X, 500 g , 10 minutos, 5^0C) e fixadas em 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio pH 7,2 contendo 2,5% de glutaraldeído (1 hora, 4^0C). Posteriormente, as preparações foram lavadas no mesmo tampão e as células foram pós-fixadas em 1% de OsO_4 em água bidestilada. Apos desidratação em acetona as amostras foram incluídas em resina Epon. Seções de cortes foram obtidas em

Ultramicrótomo (Reichert Division Leica AG, Áustria). Os cortes foram contrastados com solução aquosa de acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo, para observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiis EM 1oC (Carl Zeiss, Oberkuchen, Alemanha).

13. Ensaios *in vivo*

13.1 Infecções experimentais

Camundongos machos das linhagens BALB/c e C57BL/6, foram infectados por via intraperitoneal (IP) com 10^5 tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* clone Dm28c.

A parasitemia foi determinada em amostras de sangue (10 µl) retiradas da cauda dos animais e colocadas em Lâminas cobertas por lamínulas. O número de parasitas sanguíneos foi diariamente avaliado por contagem em câmara de Neubauer.

13.2 Contagem total e diferencial das células do lavado peritoneal

A contagem total de leucócitos do exsudato peritoneal foi realizada por microscopia ótica usando câmara de Neubauer. Para contagem diferencial dos leucócitos , 100 µl de amostra contendo 10^5 células foram submetidas a citocentrifugação (450rpm, 5 minutos) e em seguida foram coradas pelo panótico e o número de células avaliado em microscopia de imersão (100X) .

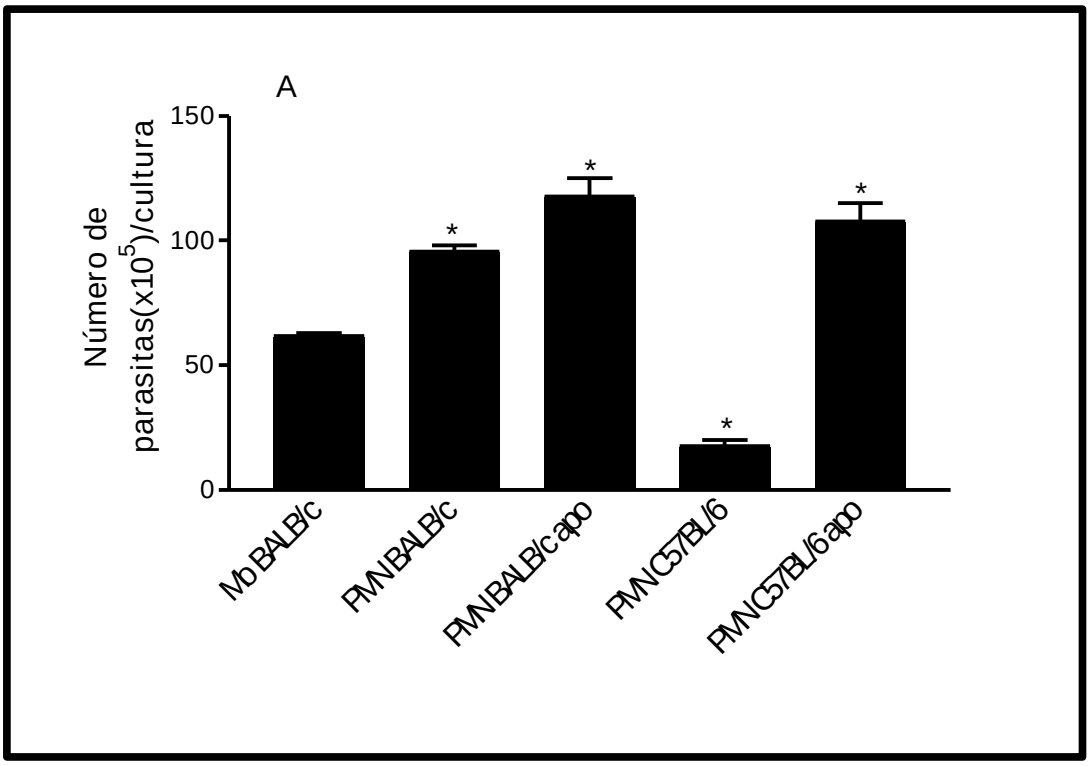
14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad InStat versão 3.01 (San Diego, EUA). Os dados foram analisados pelo método *t* de Student ou ANOVA.

Resultados

1. Efeito de neutrófilos vivos ou apoptóticos sobre culturas de macrófagos infectados com *T.cruzi.*

Para avaliar as conseqüências da interação dos macrófagos com neutrófilos em um modelo de infecção parasitária experimental pelo *T. cruzi* (clone Dm28c), macrófagos peritoneais isolados de camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram infectados com 10^5formas tripomastigostas metacíclicos, e incubados com neutrófilos viáveis ou apoptóticos. A co-cultura de neutrófilos apoptóticos com macrófagos infectados resultou no aumento da replicação dos parasitas por macrófagos de ambas as linhagens. Surpreendentemente co-culturas de macrófagos infectados com neutrófilos viáveis de camundongos BALB/c também causou o aumento na replicação de parasitas, mostrando um papel antiinflamatório semelhante ao das células apoptóticas. Em contraste, a co-cultura de neutrófilos viáveis de C57BL/6 com os macrófagos infectados impediu a liberação de *T.cruzi n*os macrófagos, sugerindo um efeito imunomodulador que conseguiu impedir a replicação do parasita (fig. 3A e B) .


A
Número de parasitas(x10^5)/cultura
150
100
50
0
*
*
*
*
Mb BALB/c
PMN BALB/c
PMN BALB/c apo
PMN C57BL/6
PMN C57BL/6 apo

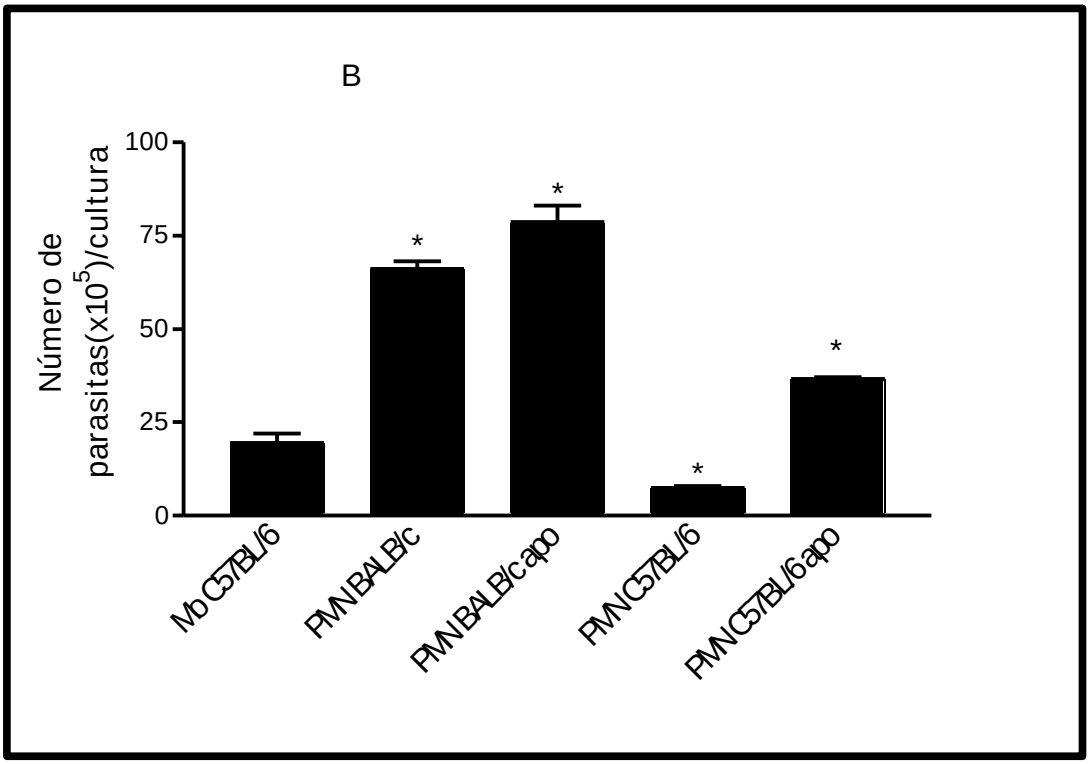

B
Número de parasitas(x10^5)/cultura
100
75
50
25
0
*
*
*
*
Mb C57BL/6
PMN BALB/c
PMN BALB/c apo
PMN C57BL/6
PMN C57BL/6 apo

Figura 3: Efeito de neutrófilos vivos e apoptóticos co-cultivados com macrófagos infectados com *T. cruzi*. (A) Co- cultura de macrófagos de BALB/c foram infectados *in vitro* com 10^5 tripomastigotas metacíclicos e cultivados com neutrófilos viáveis ou apoptóticos de BALB/c e C57BL/6. (B) Co-cultura realizada com macrófagos da linhagem C57BL/6 com neutrófilos. Após 7 dias os parasitas liberados foram contados em câmaras de Neubauer . As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (com apenas macrófagos infectados) * $p<_ 0.05$, determinado pelo ANOVA. As barras referem-se a +/- SEM.

2. A adição de um inibidor de morte celular confirma a viabilidade dos neutrófilos de BALB/c

Para confirmar a viabilidade dos neutrófilos provenientes de camundongos BALB/c e descartar a apoptose precoce destas células, nós utilizamos um inibidor de caspase (Z-VAD). A adição do inibidor não interferiu no aumento do número de parasitas na cultura, como observado somente com os neutrófilos viáveis de BALB/c. Esses resultados sugerem que neutrófilos viáveis de BALB/c neste modelo possuem um efeito imunomulador negativo, inibindo a resposta do macrófago e favorecendo o crescimento do parasita.

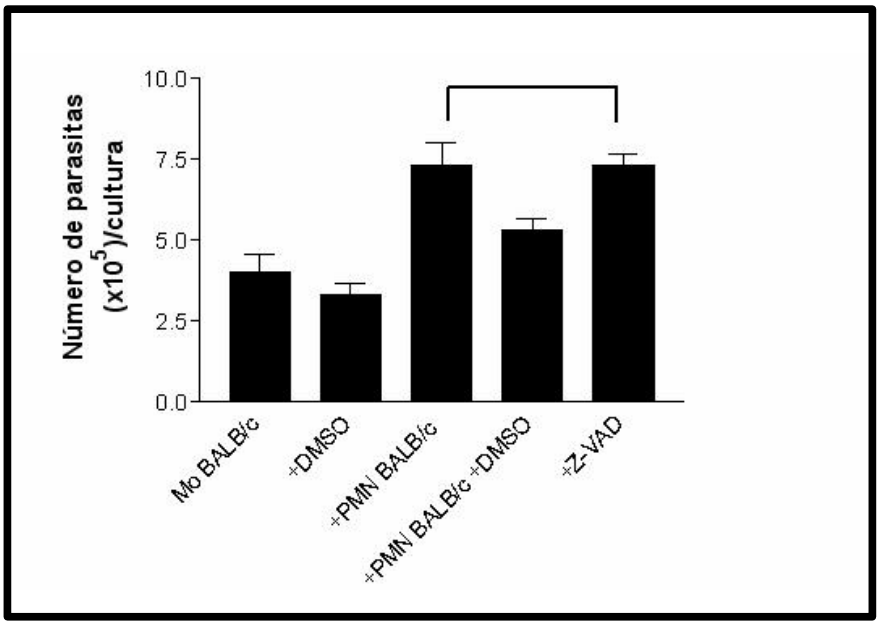


Figura 4: A adição de um inibidor de morte celular confirma a viabilidade dos neutrófilos de BALB/c. Co-cultura com macrófagos peritoneais residentes de BALB/c com neutrófilos de BALB/c viáveis foram cultivados com inibidor geral de caspases Z-VAD (1µM/poço). Após 7 dias os parasitas liberados foram contados em câmaras de Neubauer . As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Média +/- SEM; n=3.

3. Ação imunomoduladora das células apoptóticas sobre o efeito microbicida dos macrófagos estimulados com os neutrófilos de C57BL/6 .

O *T. cruzi* foi usado para infectar os macrófagos peritoneais isolados de camundongos BALB/c e de C57BL/6 (dados não mostrados). Estes macrófagos foram então incubados com os neutrófilos viáveis e apoptóticos na mesma proporção (5:1 de viáveis e 5:1 de apoptóticos). Foi observado que, o efeito modulador da célula apoptótica era predominante sobre a ação microbicida induzida pelos neutrófilos viáveis de C57BL/6 (fig. 5).

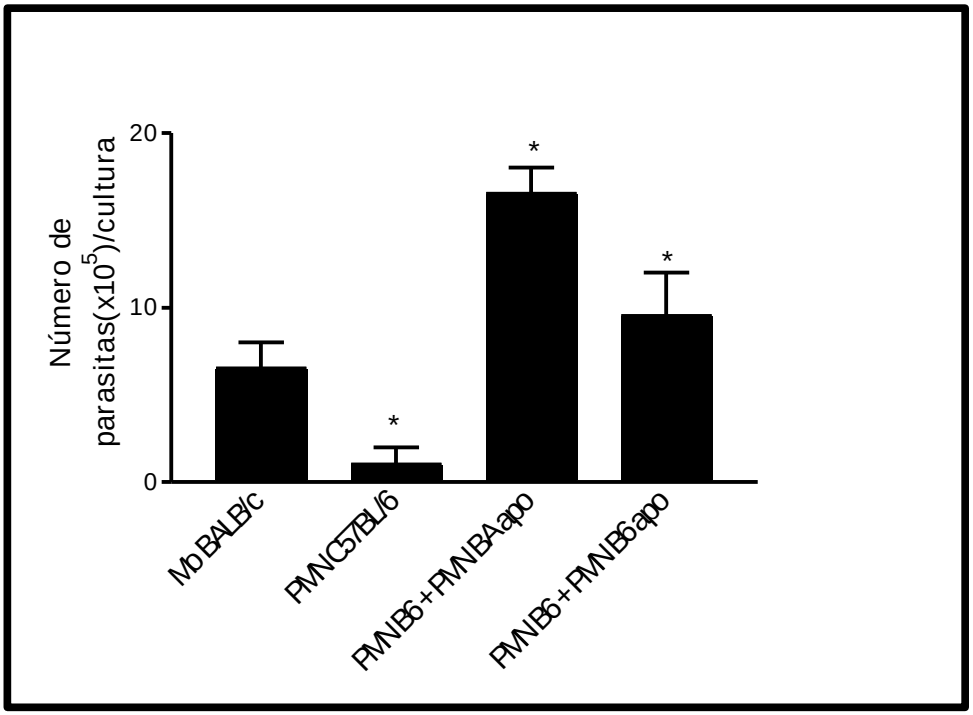


Figura 5: Interferência de neutrófilos apoptóticos sobre culturas de macrófagos infectados com *T.cruzi e* neutrófilos viáveis de C57BL/6. Co-cultura com macrófagos peritoneais residentes de BALB/c com neutrófilos viáveis e apoptóticos de BALB/c e C57BL/6 na mesma proporção (5:1 macrófago). Após 7 dias os parasitas liberados foram contados em câmaras de Neubauer. As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle de macrófagos infectados com neutrófilos de C57BL/6 * p<_ 0.05, determinado pelo ANOVA. As barras referem-se a +/- SEM.

4. Detecção de citocinas no sobrenadante de co-culturas de macrófagos infectados

Os níveis de citocinas do sobrenadante das co-culturas foram determinados por ensaios imunoenzimáticos, como descrito na metodologia. Co-cultura de macrófagos infectados com neutrófilos apoptóticos ou viáveis de BALB/c apresentaram níveis mais altos de TGF-â quando comparados com as outras co-culturas (Fig.6 B) . Ao contrário, na presença de neutrófilos viáveis de C57BL/6 os macrófagos produziram níveis mais altos de TNF-á (fig. 6A). Porém, a presença de células apoptóticas neste sistema bloqueia a produção de TNF-á (fig. 6 A).

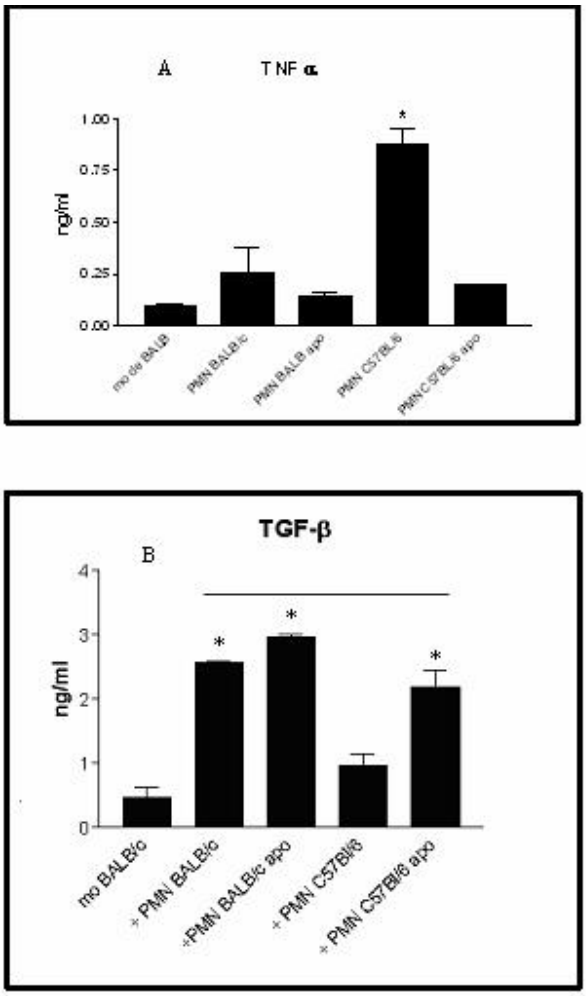
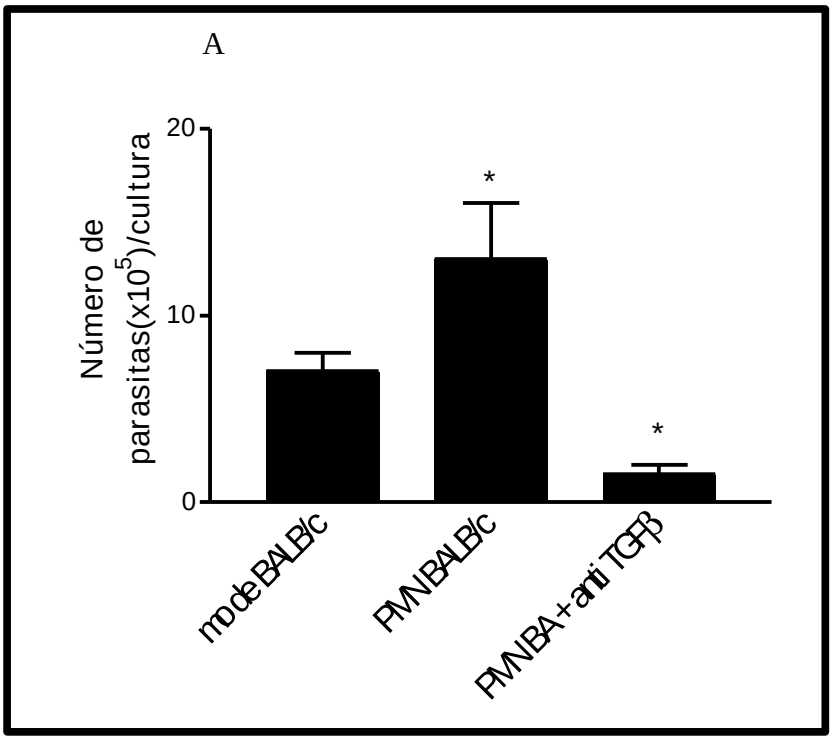


Figura 6: Produção de citocinas. Os níveis das citocinas (TGF-â e TNF-á) foram determinados por ensaio imunoenzimático em amostras de sobrenadantes de co-culturas de macrófagos de BALB/c infectados com neutrófilos . Os ensaios foram realizados com amostras obtidas após 24 horas. As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (macrófagos infectados) * p<_ 0.05, determinado pelo ANOVA. As barras referem-se a +/- SEM.

5. Participação de citocinas na modulação da infecção

Para confirmar a participação das citocinas neste modelo de infecção, adicionamos anticorpos neutralizantes anti- TGF-â e anti-TNF- á nas co-culturas. O anticorpo anti-TGF-â reduziu o aumento do numero de parasitas na cultura , quando macrófagos foram co-cultivados com neutrófilos de BALB/C viáveis (fig 7A) e o anti- TNF-á, inibiu o efeito microbicida encontrado nas co-culturas com neutrófilos viáveis de C57BL/6 (fig.7 B).



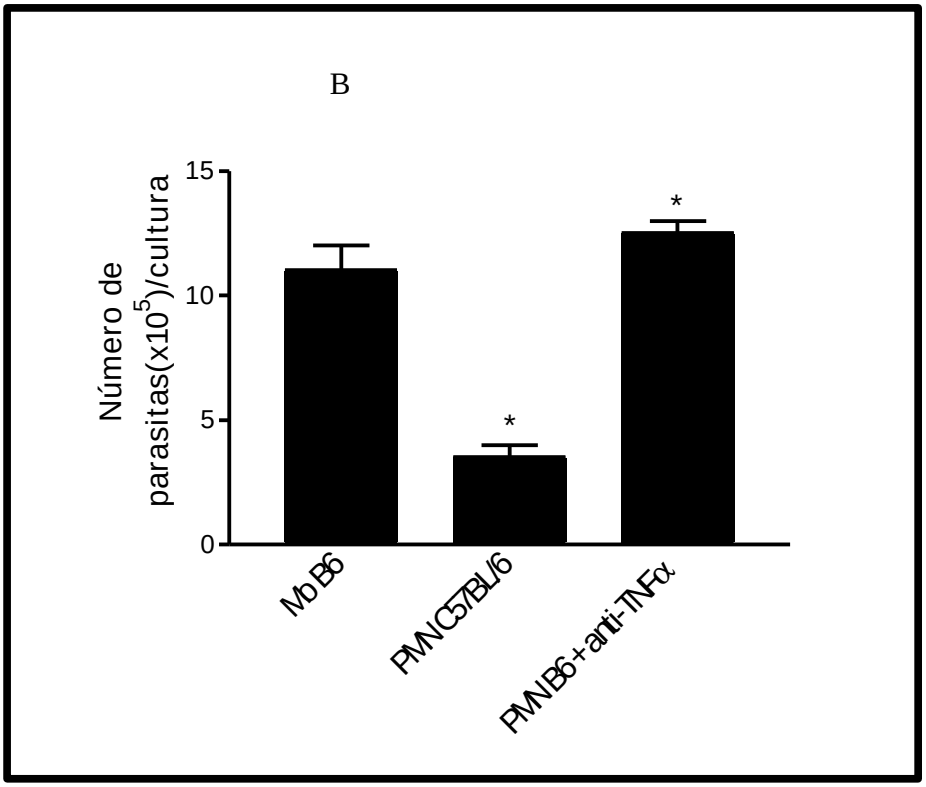


Figura 7: Participação de citocinas na modulação da infecção. Em co-culturas de macrófagos infectados com neutrófilos viáveis foram adicionados anticorpos monoclonais anti -TGF-â (A) e anti-TNF-á (B) (10µg/ml) . Após 7 dias os parasitas liberados foram contados em câmaras de Neubauer . As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (macrófagos infectados na presença de neutrófilos de C57BL/6) * p<_ 0.05, determinado pelo teste *t*. As barras referem-se a +/- SEM.

6. Envolvimento de prostaglandina E_2

Um outro mediador analisado foi a prostaglandina E_2 (PGE_2), pois é sabido que este mediador pode atuar como um mediador antiinflamatório em alguns modelos de experimentais infecções (Freire-de-Lima, *et.al.*, 2000; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004).

Foi observado que, tanto as co-culturas de macrófagos com neutrófilos viáveis como com neutrófilos apoptóticos apresentaram níveis elevados de PGE_2 comparado com o controle (fig8/tab 1).

Macrófago de BALB/c	82 pg/ml
Macrófago de BALB/c + LPS	> 1 ng/ml
Macrófago de BALB/c infectado	174 pg/ml
Macrófago de BALB/c infectado + LPS	> 1 ng/ml
Macrófago de BALB/c + PMN viável	> 1 ng/ml
Macrófago de BALB/c + PMN apoptótico	> 1 ng/ml

Figura 8: Envolvimento de prostaglandina E_2. Níveis de PGE_2 foram determinados em amostras de sobrenadantes de co-culturas de BALB/c infectados ou não com neutrófilos viáveis e apoptóticos por ensaio imunoenzimático (EIA) como descrito na metodologia. Os ensaios foram realizados com amostras obtidas após 24 horas de cultura. As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os resultados foram expressos em forma de tabela devido a alta concentração de PGE_2 que sempre saia da curva padrão mesmo efetuando diluições.

7. Efeito da inibição de prostaglandinas sobre co-culturas de neutrófilos e macrófagos infectados com *T.cruzi* de BALB/c viáveis

O precursor primário das prostaglandinas é o ácido aracdônico que pode ser metabolizado por uma enzima, a ciclo-oxigenase (COX) em uma prostaglandina endoperóxido, como a PGH2. Esta pode ser convertida em prostanoides vasoativos mais estáveis, como a PGE_2. Os anti-inflamatórios como a indometacina (MSAID) inibem a ciclo-oxigenase, impedindo assim a síntese de prostaglandinas que são importantes mediadores lipídicos. Para avaliar o envolvimento da PGE_2 neste modelo, adicionamos nas co-culturas de macrófagos de BALB/c infectados com neutrófilos de BALB/c viáveis, um inibidor de COX (indometacina , 10µg/ml). Onde observamos que, na presença deste inibidor o efeito imunossupressor dos neutrófilos sobre os macrófagos era revertido (Fig 9).

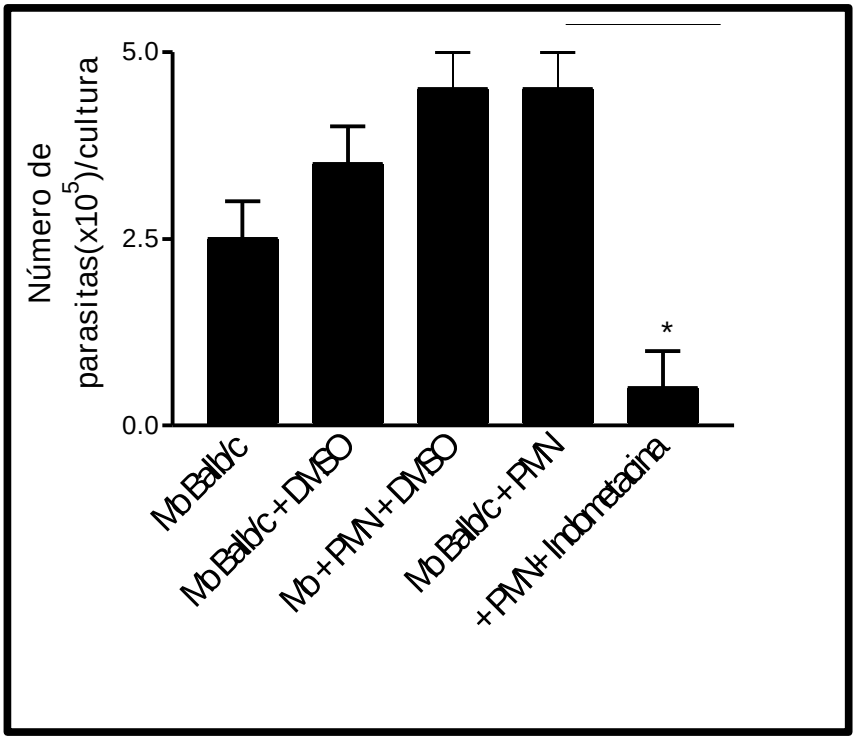


Figura 9: Efeito de indometacina sobre co-culturas de macrófagos infectados com *T. cruzi* e neutrófilos viáveis de BALB/c. Co-culturas de macrófagos infectados de BALB/c com neutrófilos de BALB/c foram incubadas com Indometacina e seus respectivos controles (10µg/ml) e após 7 dias os parasitas liberados foram contados em câmaras de Neubauer . As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. O asterisco indica significância estatística em relação ao controle (macrófagos infectados na presença de neutrófilos de BALB/c)* p<_ 0.05, determinado pelo teste *t*. As barras referem-se a +/- SEM.

8. O efeito microbicida dos neutrófilos de C57BL/6 é dependente de NO.

É descrito um importante papel do óxido nítrico na infecção chagásica experimental (Martins *et al.,* 1998). O NO, cuja via bioquímica de síntese foi inicialmente elucidada em macrófagos murinos ativados, é um importante mensageiro químico nas interações celulares (Lowenstein & Snynder, 1992) A síntese de NO, ocorre através da conversão da L-arginina por ação da óxido nítrico sintase (iNOS), que é induzida nos macrófagos, mediante estimulação (Lowenstein & Snyder, 1992).

Na figura 10, é possível observar a maior expressão de iNOS em macrófagos(A), induzida pelos neutrófilos de C57BL/6 em comparação com macrófagos infectados. Também foi possível observar a elevada produção de nitrito (B) Dispomos também de um inibidor seletivo da iNOS (L-NIL), onde observamos que a presença deste inibidor revertia o efeito imunomodulador dos neutrófilos de C57BL/6 sobre os neutrófilos de ambas as linhagens (C).

10A

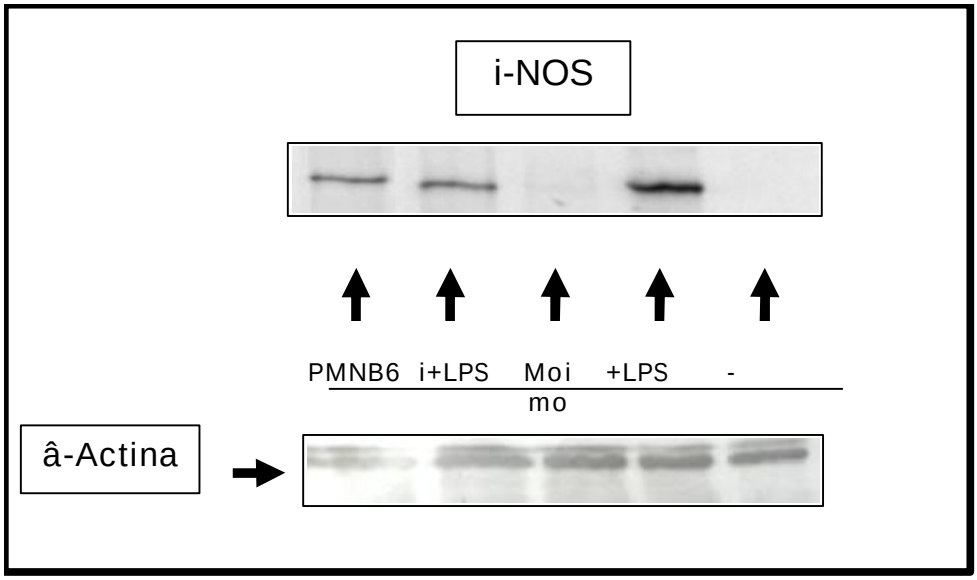
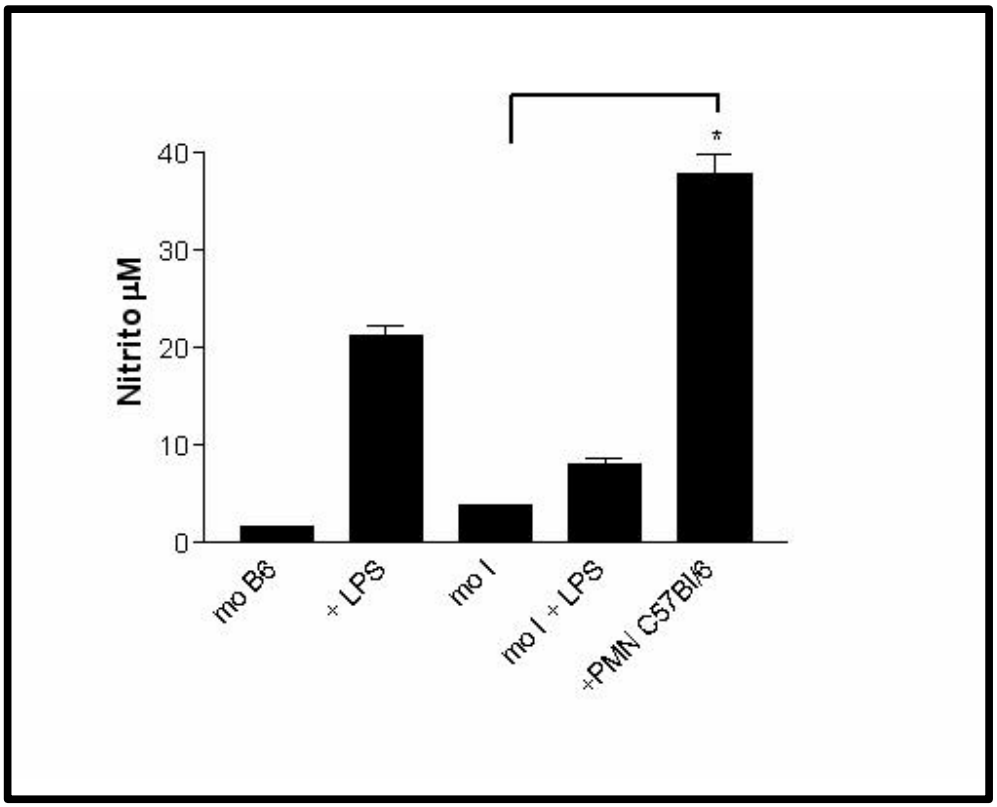


Figura 10: O efeito microbicida dos neutrófilos de C57Bl/6 é dependente de NO.

Macrófagos peritoneais de BALB/c e C57BL/6 foram incubados com neutrófilos de C57BL/6 por 24 horas e a expressão de iNOS detectada por Western blotting . A figura 10A mostra a maior expressão da enzima nos macrófagos co-cultivados com neutrófilos de C57BL/6: - só macrófago;

- + LPS macrófagos mais LPS;
- Macrófagos infectados;
- I+ LPS macrófagos estimulados com LPS e;
- PMNB6 macrófagos infectados estimulados com neutrófilos de camundongos C57BL/6.

10B


Nitrito µM
40
30
20
10
0
*
mo B6
+ LPS
mo I
mo I + LPS
+PMN C57Bl/6

10C

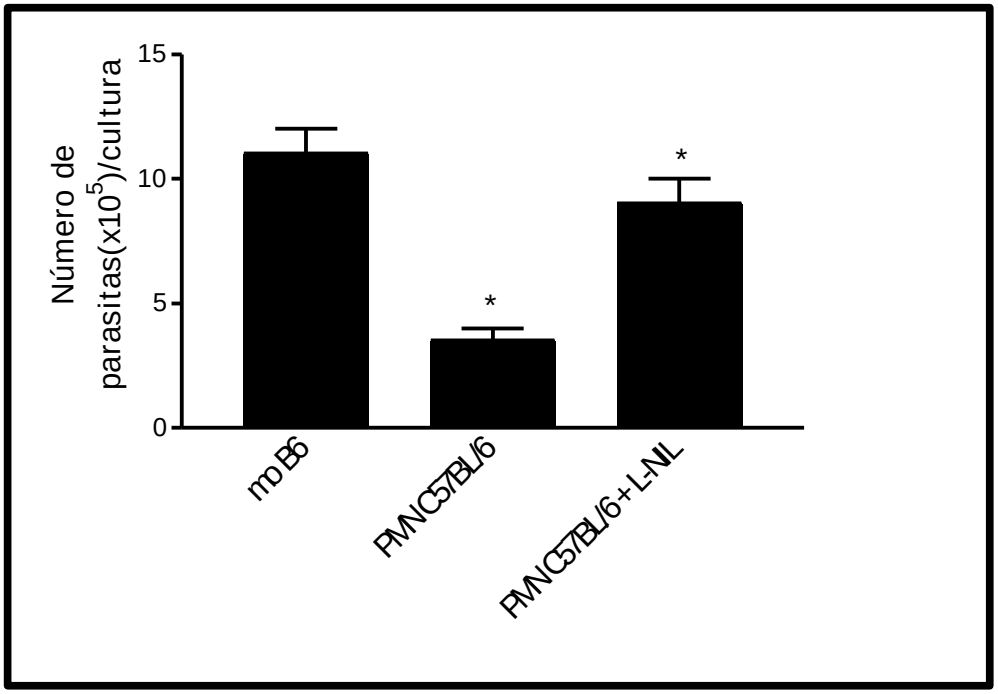

Número de parasitas(x10^5)/cultura
15
10
5
0
*
*
mo B6
PMN C57BL/6
PMN C57BL/6+L-NIL

Figura 10: O efeito microbicida dos neutrófilos de C57Bl/6 é dependente de NO.

Na figura 10B pode-se observar a maior produção de nitrito encontrada no sobrenadante das co-culturas com neutrófilos de C57BL/6 após 24 horas. Também foi avaliada inibição da produção do NO na presença do inibidor seletivo (L-NIL) e a interferência sobre o crescimento do parasita nos macrófagos das duas linhagens estudadas (10C). Após 7 dias os parasitas liberados foram contados em câmaras de Neubauer . As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle * p<_ 0.05, determinado pelo teste *t*. As barras referem-se a +/- SEM.

9. O efeito microbicida dos neutrófilos de C57BL/6 não depende de contato celular.

Para avaliar a dependência do contato celular entre os macrófagos e os neutrófilos de C57Bl/6. Macrófagos foram co-cultivados com neutrófilos com a interferência de uma membrana (0,22mm) por 7 dias, o que impediu o contato celular (Transwell). Foi observado que o efeito microbicida dos neutrófilos não é dependente de contato celular e que, na ausência do contato a inibição da replicação do *T. cruzi* foi maior.

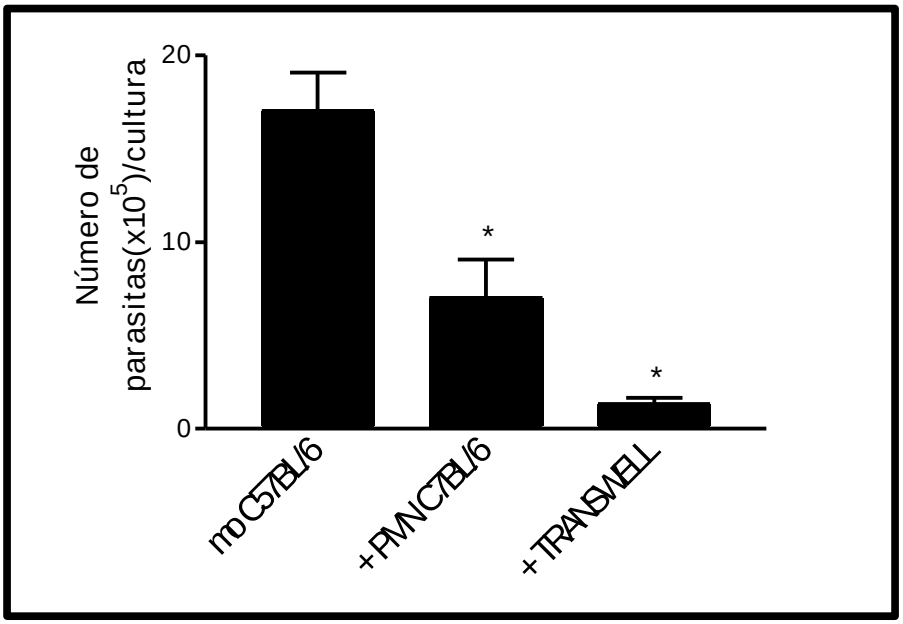


Figura 11: O efeito microbicida dos neutrófilos de C57BL/6 não depende de contato celular. Macrófagos foram co-cultivados com neutrófilos com ou sem a interferência de uma membrana (0,22mm), o que impediu o contato celular. O número de tripomastigotas foi contado em câmara de Neubauer no sétimo dia de cultura. As deter minações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (macrófagos infectados na presença dos neutrófilos de C57BL/6 * p<_ 0.05, determinado pelo teste *t*. As barras referem-se a +/- SEM.

10. Efeito da inoculação intraperitoneal do *T. cruzi* em duas linhagens de camundongos isogênicos.

Investigamos a diferença de parasitemia entre duas linhagens de camundongos, BALB/c e C57BL/6 , durante 30 dias de infecção pelo *T. cruzi* . Os camundongos BALB/c apresentaram uma maior parasitemia com pico máximo em torno de 23 dias de infecção. Por outro lado, nos experimentos feitos com animais C57BL/6 podemos observar uma parasitemia baixa.

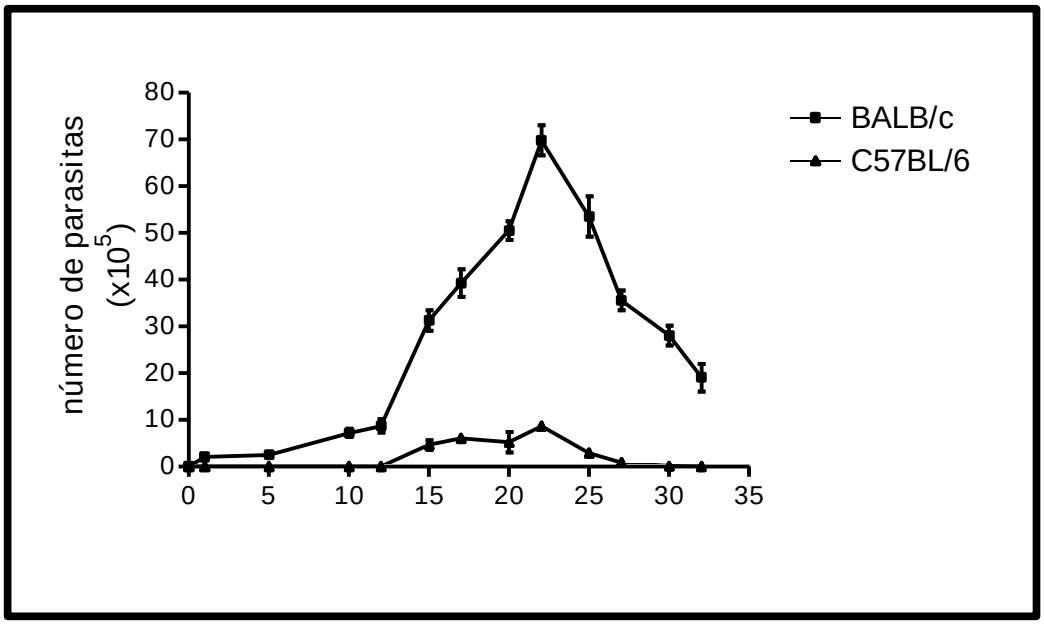


Figura 12: Curva de parasitemia do *T. cruzi* em duas linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6. Os animais foram infectados via intraperitoneal com 10^5 tripomastigotas/ml. A parasitemia dos animais foi acompanhada durante 30 dias. Cada grupo foi formado por 6 camundongos e os pontos representam a média e desvio padrão dos dados avaliados no experimento.

11. Análise dos tipos celulares presentes no lavado peritoneal nas duas linhagens de camundongos estudados.

Na contagem diferencial, podemos observar uma maior quantidade de neutrófilos no lavado peritoneal dos camundongos BALB/c infectados, quando comparamos com os animais C57BL/6. Observamos que após 2 horas houve um influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal, e o pico ocorreu após 6 horas de infecção. Após 24 horas esse número reduzia drasticamente, visto que neutrófilos morrem muito rápido depois de ativados.

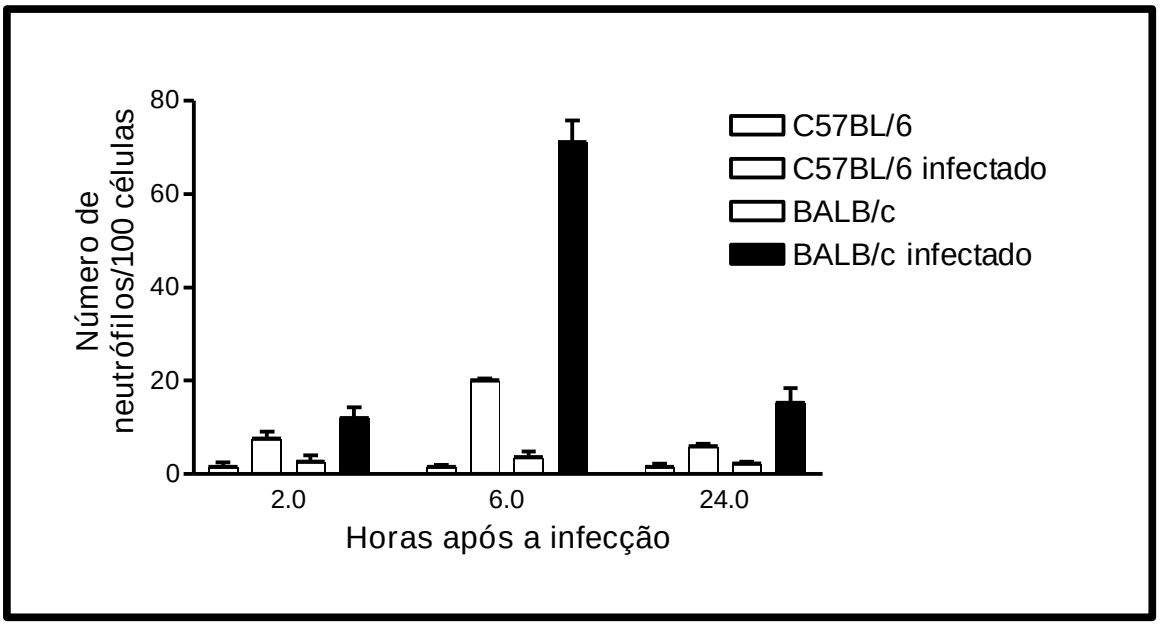


Figura 13: Análise dos tipos celulares presentes no lavado peritoneal nas duas linhagens de camundongos estudados. Os neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal foram detectados por contagem em câmara de Neubauer em microscopia ótica nos animais infectados e não infectados das diferentes linhagens. A neutrofilia foi acompanhada por 24 horas pós-infecção. Os valores representam à média e o desvio padrão dos dados avaliados no experimento. Cada grupo foi formado por 6 amimais.

12. Microscopia óptica do lavado peritoneal das duas linhagens isogênicas de camundongos infectados com *T. cruzi*.

Com os estudos de microscopia óptica do lavado peritoneal dos animais infectados, observamos uma variedade de tipos celulares. Após 6 horas de infecção foi possível detectar células como monócitos e neutrófilos no sítio inflamatório. Na figura 18 estão representadas duas imagens obtidas por microscopia ótica dos tipos celulares presentes nas duas linhagens de camundongos estudadas, onde podemos observar uma quantidade maior de neutrófilos no lavado peritoneal dos camundongos BALB/c infectados, quando comparamos com o lavado peritoneal dos animais C57BL/6 infectados (Figura 14 A e B, respectivamente).

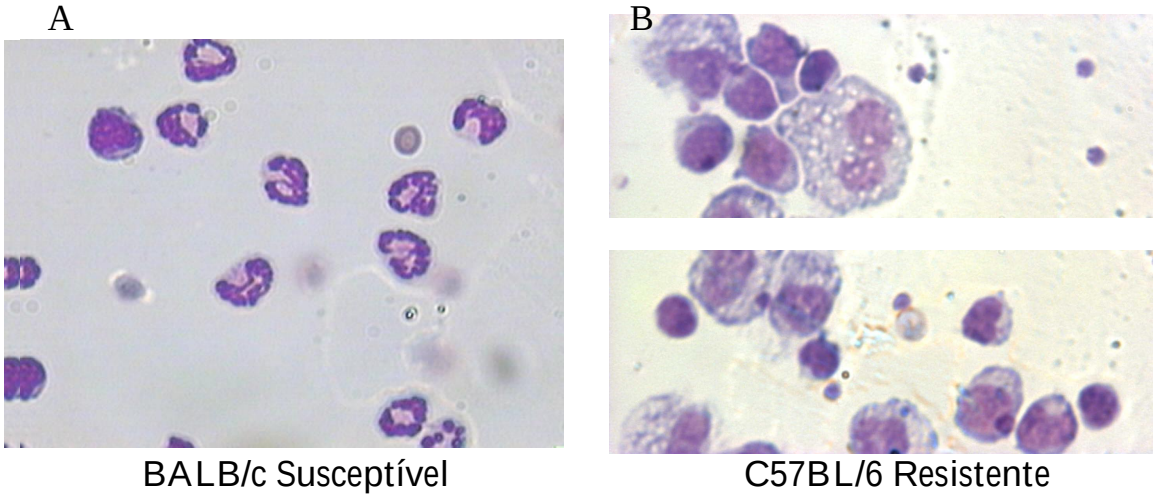


Figura 14: Foto-microscopia óptica do lavado peritoneal das duas linhagem isogênicas de camundongos infectados com *T. cruzi*. O campo (A) representa o exsudato peritoneal do camundongo BALB/c e o (B) do camundongo C57BL/6, ambos com 6 horas de infecção. Estes dados foram analisados por citocentrifugação do lavado peritoneal dos animais. As preparações celulares foram coradas com panótico. As imagens foram observadas com objetiva de 40X.

13. Microscopia eletrônica de células obtidas do lavado peritoneal de camundongos BALB/c

Nos estudos de microscopia eletrônica foi possível analisar com mais detalhes alguns aspectos da morfologia dos neutrófilos e as suas interações com os macrófagos. Nesses ensaios observamos que entre 8 e 24 horas de infecção os neutrófilos sofriam mudanças no padrão morfológico. As mudanças detectadas foram: o aumento da eletrodensidade celular, a fragmentação nuclear e a aparente integridade da membrana celular. Estas alterações correspondem ao padrão típico de morte celular por apoptose, como previamente descrito por Kert *et al.,(*1972). Esses ensaios de microscopia eletrônica foram feitos somente com células obtidas do lavado de camundongos BALB/c, pois esta linhagem foi a que apresentou maior neutrofília, e esta neutrofilia diminuía significativamente após 24 horas.

Macrófagos observados apresentaram expansões na membrana, mostrando que essas células estavam ativadas e aptas a fagocitar. Estes ensaios também revelaram que a partir de 24 horas de infecção, os neutrófilos apoptóticos eram fagocitados pelos macrófagos. A fagocitose foi sugerida devido às expansões na membrana dos macrófagos envolvendo as células em apoptose (Fig. 15 A, B e C).

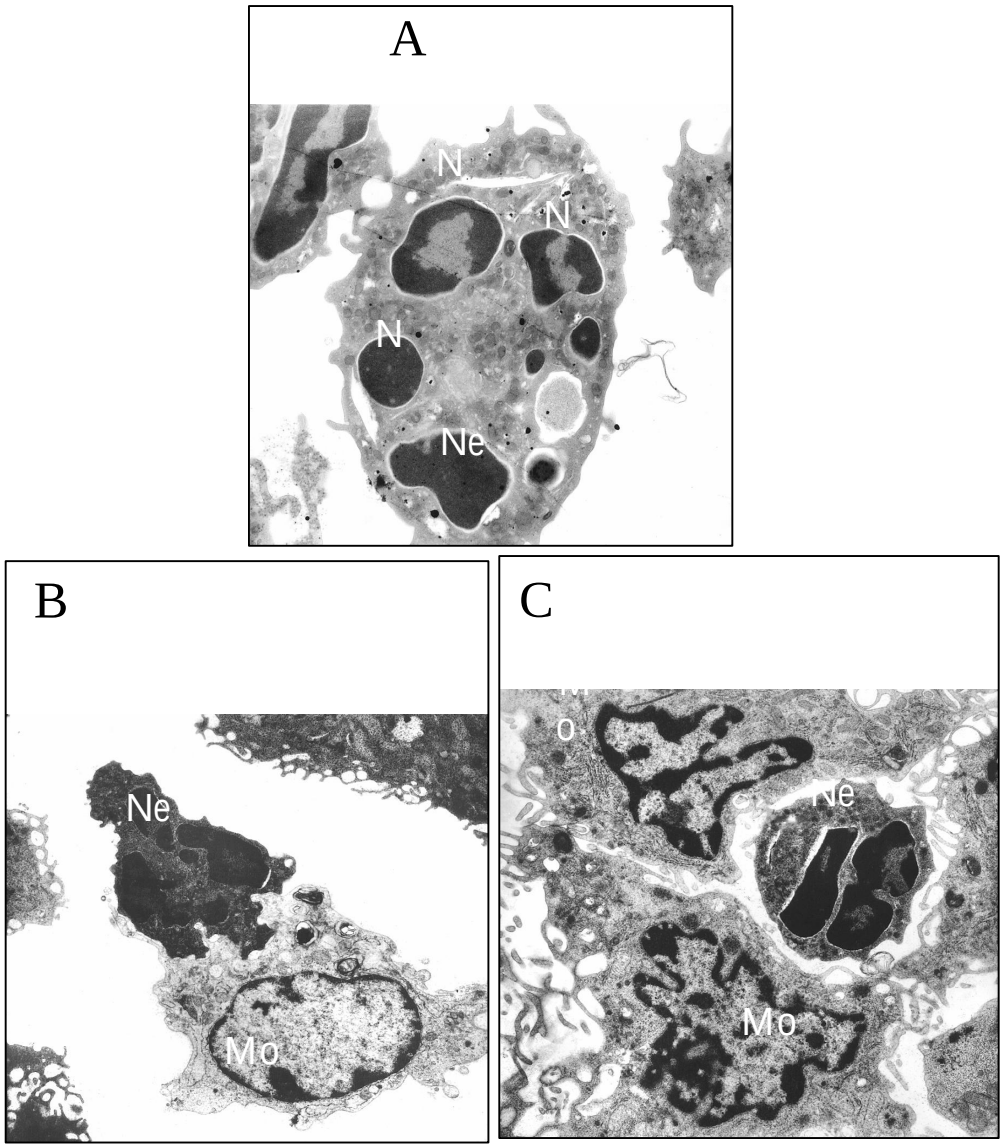
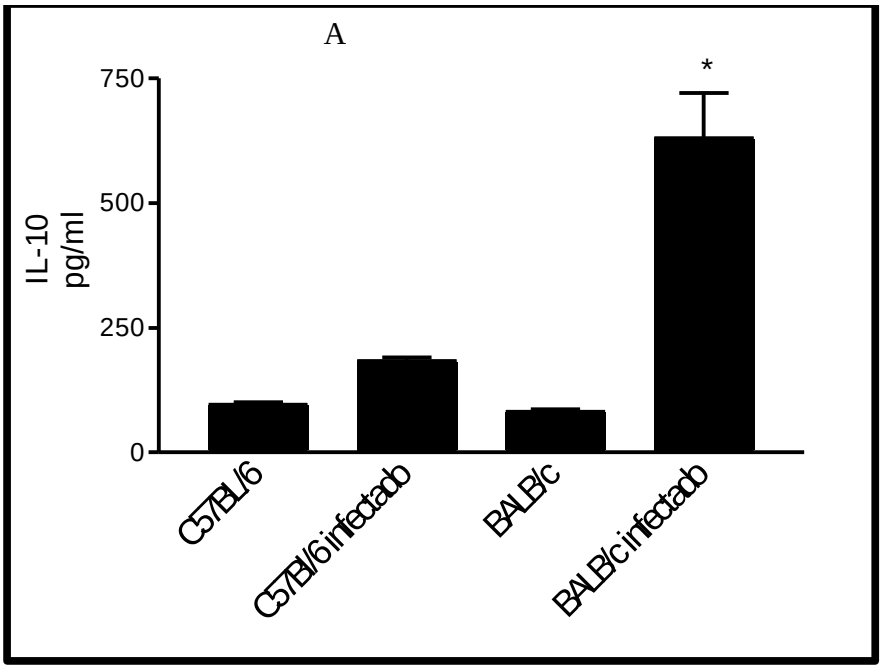
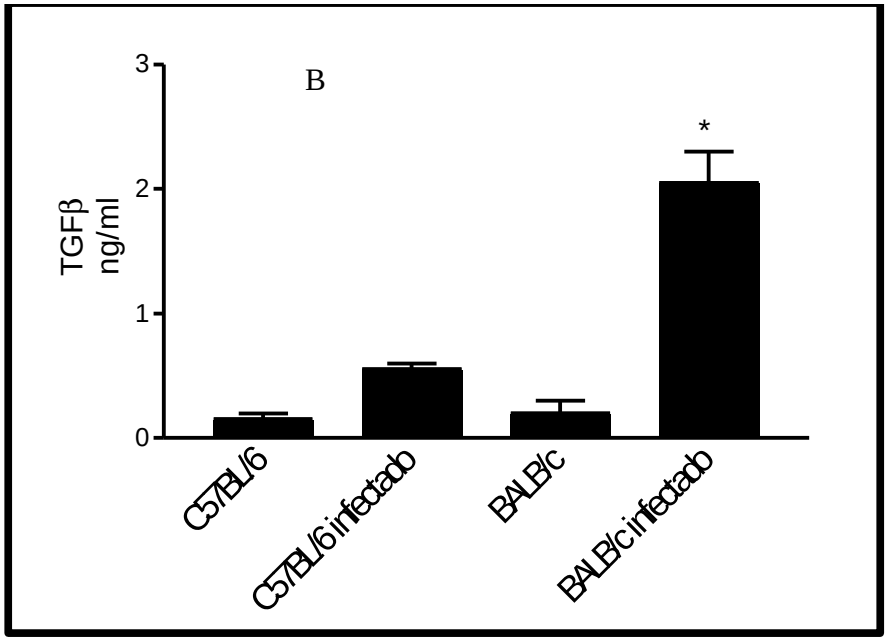


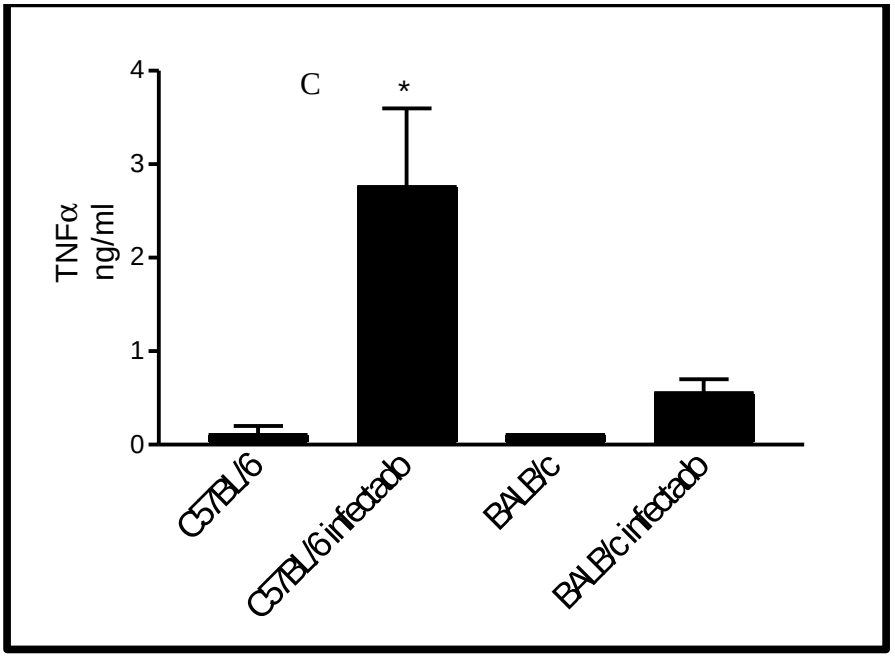
Figura 15: Microscopia eletrônica de células obtidas do lavado peritoneal de camundongos BALB/c. A imagem A representa um neutrófilo apoptótico com seu núcleo fragmentado (N) após 8 horas de infecção. A imagem B mostra o contato entre o macrófago (Mo) e um neutrófilo apoptótico (Ne), após 24 horas de infecção. Em C destacam-se os macrófagos envolvendo um neutrófilo apoptótico, também após 24 horas. As células foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 2000x.

14. Avaliação dos níveis de citocinas e PGE_2 no lavado peritoneal após 24 horas

Os níveis de PGE_2 , TGF-â, IL-10 e TNF-á do lavado peritoneal foram determinados por ensaios imunoenzimáticos como descrito na metodologia. Camundongos BALB/c demonstraram níveis mais altos de PGE_2, TGF-â, IL-10 no fluido peritoneal quando comparados com os animais C57BL/6 com o mesmo tempo de infecção. Por outro lado os nineis de TNF-á foram mais altos nos animais C57BL/6 após 24 horas (fig.16 A, B, C e D)




B
TGFβ
ng/ml
3
2
1
0
*
C57BL/6
C57BL/6 infectado
BALB/c
BALB/c infectado


C
TNFα
ng/ml
4
3
2
1
0
*
C57BL/6
C57BL/6 infectado
BALB/c
BALB/c infectado

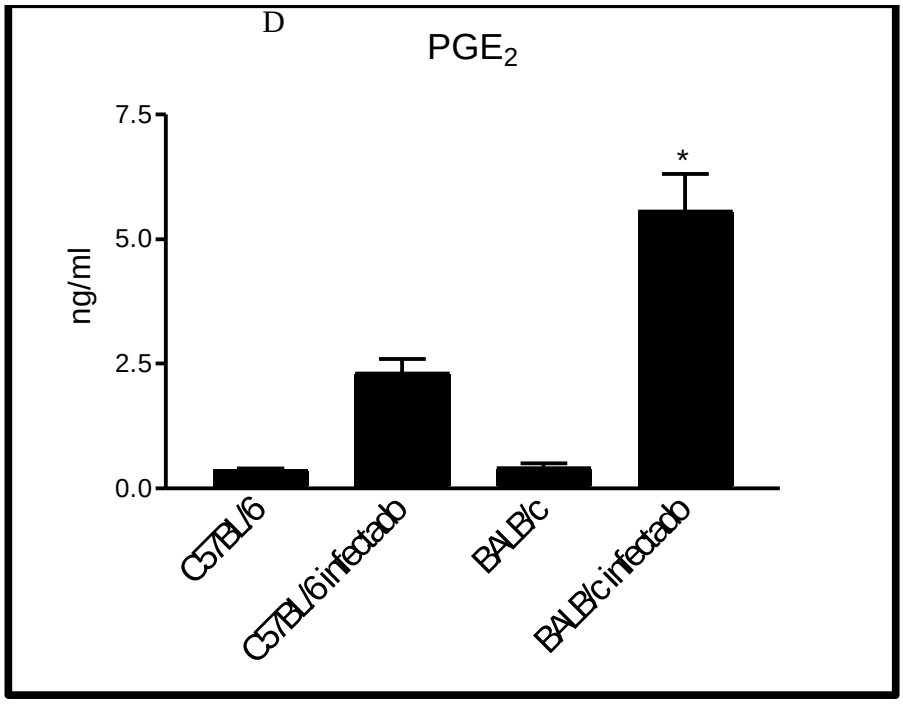


Figura 16: Quantificação de citocinas e PGE_2 do fluido peritoneal dos camundongos de BALB/c e C57BL/6 infectados ou não. Os níveis das citocinas (TGF-â, TNF-á e IL-10) e de PGE_2 foram determinados por ensaio imunoenzimático em amostras de fluido peritoneal obtidas de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *T. cruzi*. Os ensaios foram realizados após 24 h de infecção. Os grupos de animais não infectados foram mantidos em gaiolas separadas sob as mesmas condições dos animais infectados. Os dados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão das análises feitas de cada grupo contendo 6 animais.

15. Participação de proteases na ação moduladora dos neutrófilos de C57BL/6.

Para avaliar uma possível participação de proteases na ação imunomoduladora dos neutrófilos de C57BL/6 foi adicionado a co-cultura de neutrófilos de C57BL/6 com macrófagos de C57BL/6, PMSF, que é um inibidor de diversas proteases (0.1 mM). Onde foi observada a importância das proteases nesse sistema , pois esta droga inibiu o efeito microbicida dos macrófagos estimulados pelos neutrófilos de C57BL/6 (fig.17).

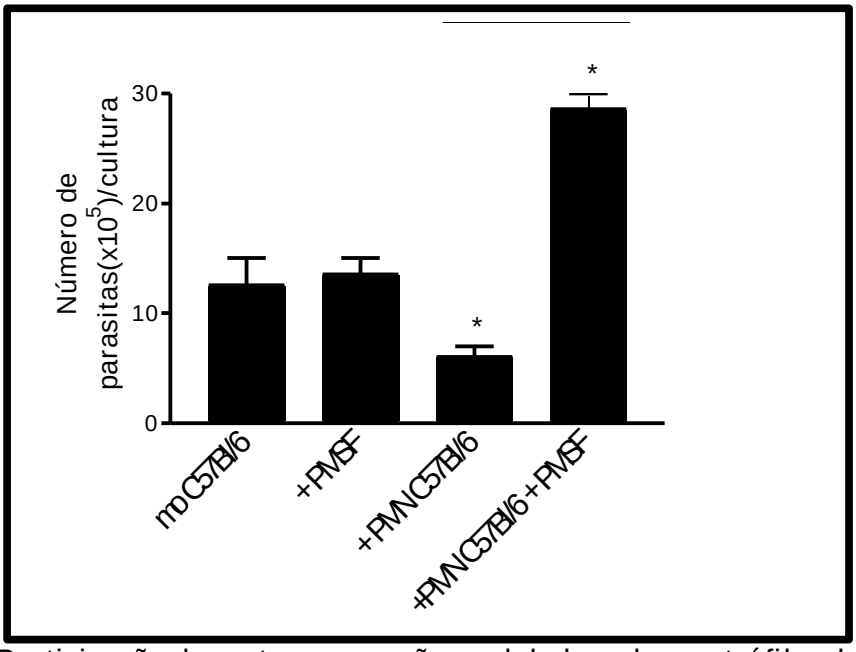


Figura 17: Participação de proteases na ação moduladora dos neutrófilos de C57Bl/6.

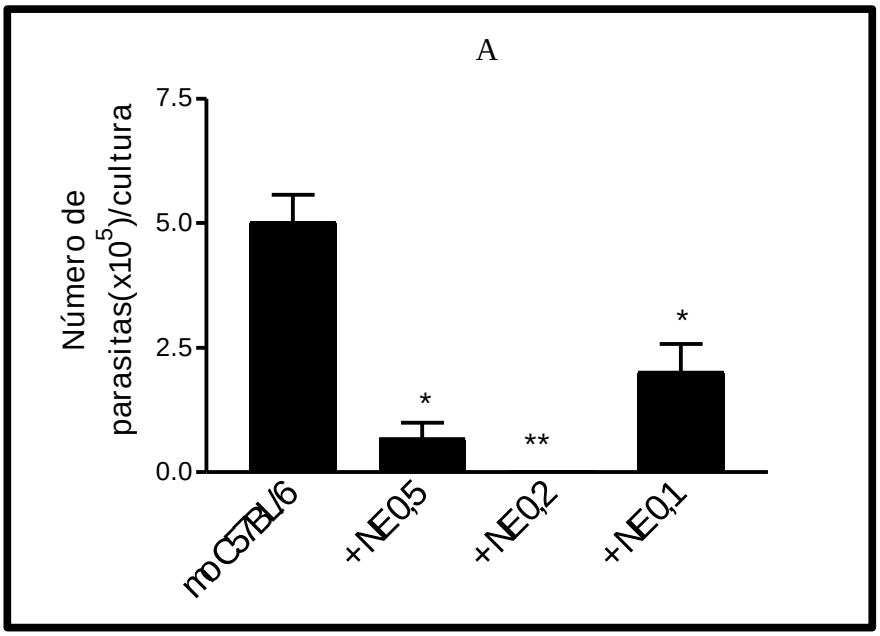
Foi adicionado a co-cultura de neutrófilos de C57BL/6 com macrófagos de C57BL/6, PMSF, que é um inibidor geral de proteases (0.1 mM) e o número de tripomastigotas foi contado em câmara de Neubauer no sétimo dia de cultura. As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes.

Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (macrófagos infectados na presença de neutrófilos de C57BL/6) * p<_ 0.05, determinado pelo teste *t*. As barras referem-se a +/- SEM.

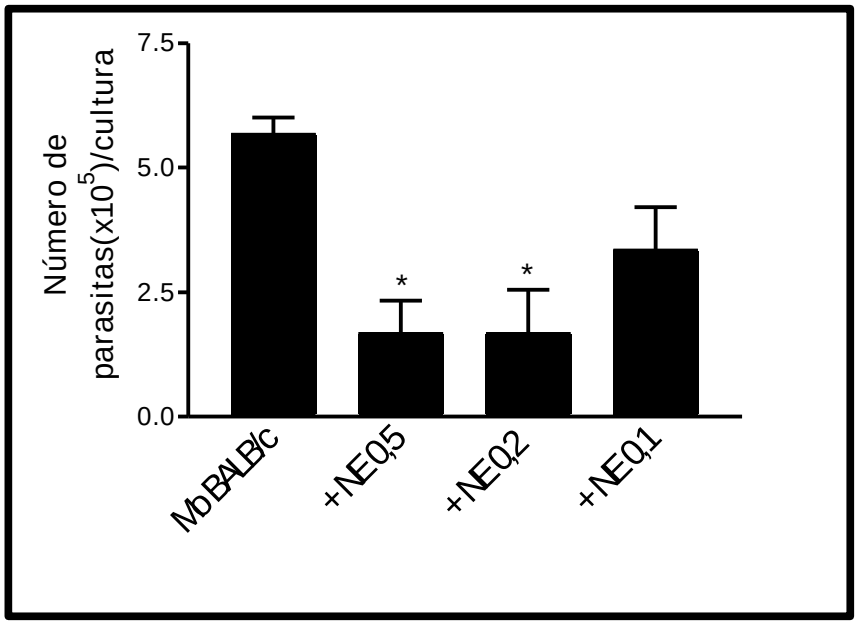
16. Elastase neutrofílica e o crescimento do *T. cruzi in vitro.*

A elastase neutrofílica é uma serino protease encontrada nos grânulos primários dos neutrófilos e vem sendo demonstrado que, esta, é capaz de induzir a produção de IL-8 via ligação com TLR4, ativando e atraindo mais neutrófilos para o sítio inflamatório (Devaney *et al*,2003). Também pode contribuir para produção de mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos (Fadok et al, 2001). Como nosso grupo demonstrou o efeito da elastase na replicação de *Leishmania major in vitro* (Ribeiro–Gomes *et al*, 2004*)* foi avaliado o efeito da adição de elastase neutrofílica (0,1; 0,2 e 0,5 mg/ml) em culturas de macrófagos infectados com *T. cruzi*, onde também foi possível observar a inibição da replicação do parasita. A adição do inibidor seletivo de elastase foi utilizada e este, inibiu seu efeito microbicida dos macrófagos de C57BL/6 estimulados com neutrófilos de C57BL/6 (fig 18 A,B e C).

A


Número de parasitas(x10^5)/cultura
7.5
5.0
2.5
0.0
*
**
*
mDC57BL/6
+NE0,5
+NE0,2
+NE0,1

B


Número de parasitas(x10^5)/cultura
7.5
5.0
2.5
0.0
*
*
MbBALB/c
+NE0,5
+NE0,2
+NE0,1

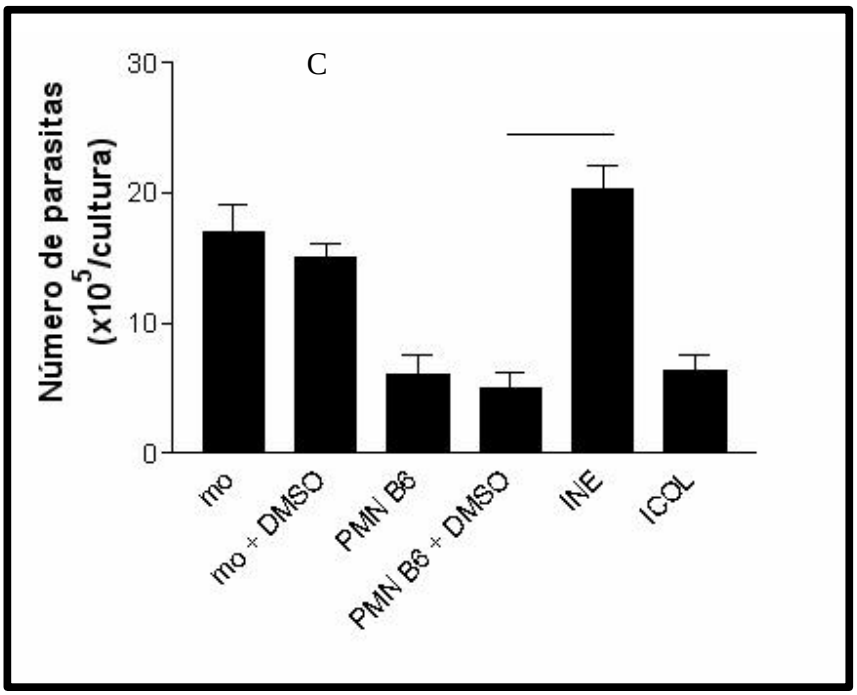
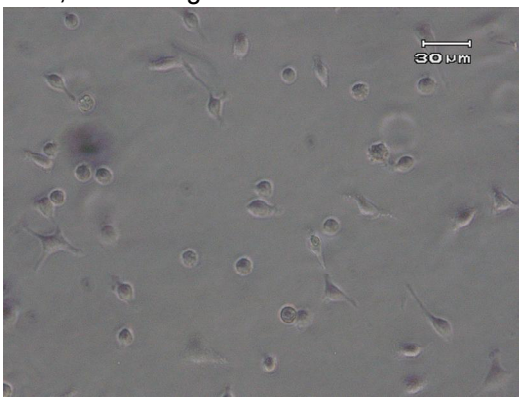


Figura 18: Elastase neutrofílica e o crescimento do *T. cruzi in vitro.* Foi avaliado o efeito da adição de elastase neutrofílica (0,1; 0,2 e 0,5 µg/ml) em culturas de macrófagos infectados , onde foi possível observar a inibição da replicação do parasita na cultura de macrófagos de BALB/c (A) e macrófagos de C57BL/6 (B). A adição do inibidor seletivo de elastase inibiu seu efeito microbicida dos macrófagos estimulados pelos neutrófilos de C57BL/6 (C). O número de tripomastigotas foi contado em câmara de Neubauer no sétimo dia de cultura . As determinações foram realizadas em triplicatas de três experimentos diferentes. Os asteriscos indicam significância estatística em relação ao controle (apenas com macrófagos infectados nas figuras A e B e na presença de neutrófilos de C57BL/6 mais o veículo utilizado na figura C) * $p <_ 0.05$, determinado pelo ANOVA ou teste *t*. As barras referem-se a +/- SEM.

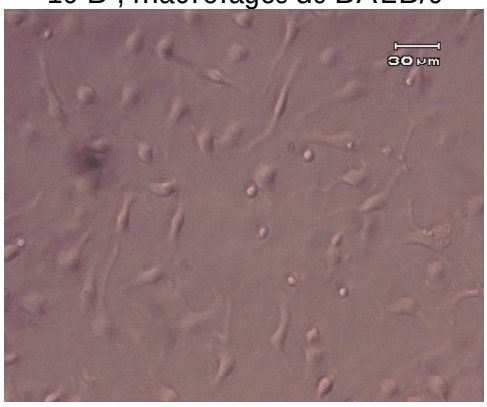
17. Ação imunomoduladora da elastase neutrofílica sobre a morfologia dos macrófagos.

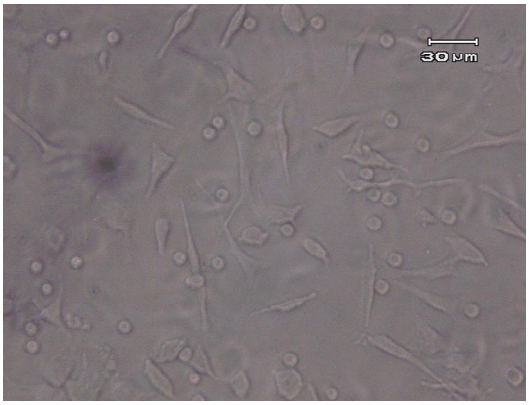
Para avaliar a ação imunomoduladora da elastase neutrofílica sobre a morfologia de macrófagos peritoneais, Células foram cultivadas com 0,2 mg/ml de elastase neutrofílica por 24 horas. A figura 19A - B, mostra macrófagos não estimulados. Nas figuras 19C –D é possível observar a intensa ativação induzida pela elastase e a alteração na morfologia celular (aumento de 200x).

19 A ; macrófagos de C57BL/6

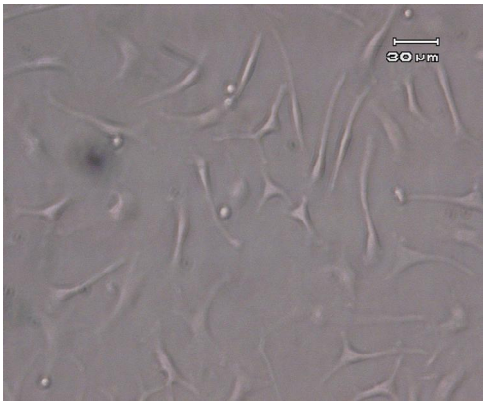


19 B ; macrófagos de BALB/c





19 C ; macrófagos de C57BL/6 + elastase



19 D ; macrófagos de BALB/c + elastase

Figura 19: Ação imunomoduladora da elastase neutrofílica sobre a morfologia dos macrófagos. Culturas de macrófagos infectados com elastase exógena foram submetidas a microscopia (aumento 200x/ microscópio invertido) e nas figuras 19C–D é possível observar a intensa ativação induzida pela elastase e a alteração na morfologia celular em comparação com culturas não estimuladas (fig. 19 A-B) (aumento de 200x/ microscópio invertido).

Discussão

Os neutrófilos são componentes essenciais da resposta imune inata e constituem a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Estas células possuem meia vida curta e estão constitutivamente programados para morrer por apoptose (Savill *et al*, 1995). A interiorização de células apoptóticas por macrófagos pode suprimir a inflamação, favorecendo a replicação intracelular de parasitas pela liberação de mediadores antiinflamatórios, que suprimem a produção de substâncias pró-inflamatórias (Freire-de-Lima *et al*., 2000; Freire-de-Lima , 2006; Lopes *et al,* 2000; Savill *et al*, 1995). Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel dos neutrófilos na doença de Chagas experimental.

O modelo murino de infecção pelo *T. cruzi* tem sido amplamente utilizado para estudar resposta imune do hospedeiro ao parasita. Vários estudos tem focalizado a identificação de fatores que podem influenciar o curso da infecção pelo *T. cruzi* (Roggero *et al.;* 2002). Nesse sentido, parâmetros como a cepa do parasita, suscetibilidade da linhagem de camundongo, a concentração do inóculo, a via de inoculação, o sexo e a idade, podem influenciar o comportamento da infecção causada pelo *T. cruzi* (Russo *et al.,* 1989).

Andrade e colaboradores (1985), ao comparar o espectro de resistência em seis linhagens isogênicas de camundongos, utilizando a mesma concentração de parasitas de três cepas diferentes do *T. cruzi,* constataram que o grau de resistência de cada linhagem de camundongo variava conforme a cepa do *T. cruzi* utilizada na infecção.

No presente trabalho, temos como de avaliar o envolvimento dos neutrófilos na infecção experimental pelo *T. cruzi*. Para tal, utilizamos o modelo murino de infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por formas tripomastigotas metacíclicas do clone Dm28c do *T. cruzi,* que resulta em imunossupressão, ativação policlonal e alterações

histopatológicas no tecido cardíaco do hospedeiro (Lopes *et. al*., 1995). A interação de neutrófilos apoptóticos com macrófagos desempenha um papel importante na resposta do hospedeiro à infecção por um outro parasita intracelular obrigatório, a *Leishmania major* (Ribeiro-Gomes *et al*, 2004).

Nossos resultados mostraram que tanto a co-cultura de neutrófilos viáveis de camundongos BALB/c como os apoptóticos, favoreceu a multiplicação dos parasitas intracelulares em macrófagos infectados pelo *T. cruzi*. Esse aumento da carga parasitária no interior dos macrófagos está relacionado com a produção de TGF-â e PGE_2, sugerindo que no nosso sistema a adição dos neutrófilos está exercendo um efeito imunossupressor *in vitro*. O tratamento *in vitro* dos neutrófilos com o inibidor geral de caspases (z-VAD) garantiu a viabilidade dessas células, mostrando que o efeito observado era realmente dependente de neutófilos vivos. Acreditamos que esses resultados sejam os primeiros a mostrar a imunossupressão mediada por neutrófilos num modelo de infecção pelo *T. cruzi.*

Em concordância a esses resultados, Ribeiro-Gomes e colaboradores (2004) demonstraram a existência de dois tipos de PMN de acordo com o genótipo do hospedeiro: Tipo 1 para o PMN de BALB/c que induz um aumento na infecção de macrófagos pela liberação de TGF-â e PGE_2 e tipo 2 para PMN derivado de C57BL/6 que induz a inibição da replicação do parasita pela liberação de TNF-á e elastase neutrofílica. Em adição a neutralização da NE ou do TNF-á em macrófagos de C57BL/6 aumenta a replicação de *Leishmania major* fazendo com que estes macrófagos se comportem como os de BALB/c ou apoptóticos.

A supressão da resposta inflamatória induzida pela fagocitose de células apoptóticas favorece a multiplicação de microorganismos intracelulares mediada pela produção de TGF- â e PGE_2 e também pela ausência de secreção de TNF-á em macrófagos humanos

(Fadok *et. al.,* 1998). De fato, foi demonstrado que a ingestão de linfócitos apoptóticos por macrófagos infectados pelo *T. cruzi in vitro* favoreceu a multplicação intracelular do *T. cruzi* e que esse efeito foi dependente da secreção de TGF-â e PGE_2 e produção de poliaminas. Nesse sistema a interação da célula apoptótica com o receptor de vitronectina ($á_v$ $â_3$) expresso na superfície do macrófago acarretou na secreção de TGF- â (Freire de Lima *et. al.,* 2000). A exarcebação do crescimento parasitário foi revertida pela adição de anticorpo neutralizante anti-TGF-â e indometacina às culturas de macrófagos infectados pelo *T. cruzi.*

No modelo de infecção *in vitro* de macrófagos pela bactéria intracelular *Coxiella burnetti*, observou-se que a fagocitose de linfócitos apoptóticos acarretava o desenvolvimento de vacúolos, aumento da carga bacteriana e na diminuição da produção de NO (Zamboni *et al*., 2003).

O TGF-â é um mediador antiinflamatório e participa do metabolismo da L-arginina, favorecendo a produção de arginase, que estaria envolvida na atividade de ODC (ornitina decarboxilase) (Freire-de-Lima *et al,* 2000) . O estágio intracelular do *T. cruzi* necessita da ODC da célula hospedeira e da síntese de poliaminas para se multiplicar (Iniesta *et al*, 2001). É possível que este mecanismo também esteja envolvido na exacerbação do crescimento parasitário observado no presente trabalho.

Utilizando o mesmo sistema de co-cultura descrito para células de camundongos BALB/c, verificamos que quando os neutrófilos viáveis eram provenientes de camundongos C57BL/6 o efeito era oposto, isto é, a adição dos neutrófilos desses animais favorecia o controle da carga parasitária intracelular. Essa atividade tripanocida era dependente da produção de TNF-á e NO. O tratamento com anticorpo neutralizante anti-TNF-á, resultou na total reversão da capacidade microbicida dessa citocina. O NO, cuja

via bioquímica de síntese foi inicialmente elucidada em macrófagos murinos ativados, tem sido relacionado como um importante mensageiro químico nas interações celulares (Lowenstein & Snynder, 1992) e foi apontado por Martins e colaboradores (1998), como um mecanismo de indução de apoptose na doença de Chagas experimental. Ao avaliar a expressão da iNOS em nosso sistema, constatamos uma diferença na expressão dessa enzima. Macrófagos que foram co-cultivados com neutrófilos viáveis de C57BL/6 expressaram mais proteína em relação à cultura de macrófagos somente infectados. A expressão observada, foi semelhante ao do controle com LPS. Além disso, a utilização do inibidor seletivo de iNOS reverteu o efeito microbicida dos neutrófilos de C57BL/6.

Verificamos também que a adição simultânea de neutrófilos vivos e mortos às culturas de macrófagos infectados não foi capaz de reverter à desativação dessas células induzida pelos neutrófilos apoptóticos.

O controle da multiplicação intracelular do *T. cruzi* induzido pelos neutrófilos viáveis de C57BL/6 parece não depender de contato, visto que quando as células estavam separadas por uma membrana, o efeito microbicida não foi abolido. Pelo contrário, observamos um aumento na capacidade tripanocida que pode estar relacionado com a ausência da via de desativação dos macrófagos pela remoção de neutrófilos apoptóticos. As células apoptóticas expressam em sua superfície celular moléculas que são reconhecidas por receptores na superfície de macrófagos (receptor de fosfatidilserina , CD51, CD61 e CD31) (Fadok *et al.*; 1998).

Em nossos ensaios *in vivo*, acompanhamos o perfil de parasitemia dos animais estudados durante um período de 30 dias e foi possível observar que o grupo de camundongos BALB/c apresentou um número acentuado de parasitas no sangue, quando comparados com o grupo de camundongos C57BL/6. Essas observações estão de acordo

com Nogueira e colaboradores (1981) que demonstraram o perfil de susceptibilidade e resistência dessas linhagens .

Nos nossos experimentos verificamos uma diferença quantitativa e qualitativa na migração celular para a cavidade peritoneal nas duas linhagens de camundongos utilizadas. Nos animais BALB/c observamos uma intensa migração de neutrófilos para o sítio inflamatório ao contrário dos animais C57BL/6 infectados , que apresentaram neutrofilia menor.

Ao comparar os resultados obtidos por microscopia ótica e eletrônica, confirmamos que os camundongos BALB/c infectados pelo *T. cruzi* apresentavam neutrofilia significativa já na fase precoce da infecção (6 horas após injeção dos parasitas). Alterações morfológicas características de morte celular por apoptose foram observadas 24 horas após a infecção dos animais.

A presença de neutrófilos já foi associada com a ocorrência de danos teciduais em doenças de origem não infecciosa como gota, artrite reumatóide, vasculite imune, infecção miocárdica , enfisema e asma (Palmblad *et al*, 2001).

Alguns trabalhos clássicos caracterizaram os tipos de células inflamatórias envolvidas nas lesões teciduais desenvolvidas no curso da doença de Chagas humana e murina (Mazza *et al*., 1938, Romaña (1963), Koberle (1968) e Andrade & Andrade (1979)). Apesar dos neutrófilos estarem presentes em grande número, as células mononucleares são os tipos mais freqüentes nas lesões teciduais da infecção chagásica experimental. Entretanto, o papel preciso das células do sistema imune inato na interação do hospedeiro com o parasita e na patogênese da doença ainda não está totalmente esclarecido.

Já foi sugerido a participação dos neutrófilos, como moduladores, tanto da resposta imune celular, quanto da humoral (Kudo *et al.,* 1993). Esta modulação ocorre

especialmente via síntese de citocinas imunoregulatórias. Chen e colaboradores (2001) demonstraram o papel dos neutrófilos na modulação da susceptibilidade e resistência em duas linhagens de camundongos isogênicos (BALB/c e C57BL/6) no modelo de infecção intraperitoneal pela cepa Tulahuén do *T. cruzi*. A depleção de neutrófilos dos animais BALB/c tornou estes animais mais susceptíveis a infecção. A análise do perfil de citocinas por RT-PCR revelou que esplenócitos de camundongos BALB/c apresentaram uma redução de RNA mensageiro para citocinas do tipo 1 (IL-12, IFN-ã, IL-2 e TNF- á). Em contraste, a depleção de neutrófilos dos camundongos C57BL/6 foi protetora, com aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Linhagens de camundongos foram classificadas de acordo com a susceptibilidade e resistência ao *T. cruzi.* Mas, esta infecção depende da cepa do parasita utilizada. Camundongos C57BL/6 são resistentes à cepa Y do *T. cruzi*, mas são susceptíveis para cepa Tulahuem (Reed, 1988). Embora esses resultados sejam contrários aos do presente trabalho, eles sugerem que a associação entre cepa do parasita, linhagem de camundongo e tamanho do inoculo e o esquema de infecção, seja determinante para as alterações na resposta inflamatória observada.

No nosso modelo experimental constatamos a importância dos neutrófilos apoptóticos na modulação negativa da infecção de macrófagos *in vivo* após 24 horas de infecção. Nesse período observamos uma intensa produção de TGF-â , PGE_2 e IL-10 no exudato da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c. Também detectamos a presença desses mediadores antiinflamatórios nos sobrenadantes das co-culturas de macrófagos infectados tanto na presença de neutrófilos de BALB/c viáveis como apoptóticos. Esses resultados sugerem que, o TGF-â , PGE_2 e IL-10 são os fatores envolvidos na supressão e

consequentemente na susceptibilidade dos animais infectados. Quando utilizamos camundongos C57BL/6 verificamos uma maior produção de TNF-á *in vitro e in vivo* .

O fenômeno de imunossupressão é bem descrito na doença de Chagas experimental e o perfil de susceptibilidade e resistência de vários modelos tem sido associados com o predomínio da produção de alguns fatores como TGF-â , PGE_2, IL-10 e diminuição da síntese de IL-2 (Michelin *et. al.,* 2005; Freire de Lima *et. al.,* 2000) . De acordo com nossos resultados, podemos associar uma maior susceptibilidade ao *T. cruzi* a intensa neutrofilia com acentuada apoptose de células e fagocitose por macrófagos recrutados para o foco inflamatório. O fenômeno oposto pode explicar o comportamento de resistência observado nos camundongos C57BL/6, com produção de TNF-á e NO (figura 25).

A elastase neutrofílica (NE) está envolvida na injúria tecidual e na inflamação mediada por neutrófilos (Lee *et al,* 2001). Foi demonstrado que a elastase induz a produção de IL-8 via ligação com TLR-4 (Devaney *et al*, 2003), ativando e atraindo mais neutrófilos para o sítio da inflamação (Walsh *et al,* 2001). Também já foi mostrado que a NE induz a produção de mediadores pro-inflamatórios e IL-10 pelos macrófagos (Fadok *et al,* 2001) além de aumentar a produção de quimiocinas (Ishihara *et al,* 1999). A elastase pancreática induz a produção de TNF-á pelos macrófagos em um mecanismo dependente de NFêB (Jaffray *et al*, 2000).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a elastase neutrofílica (Speer *et al,* 1984) e TNF-á (Liew *et al,* 1990) induzem a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos. Camundongos deficientes em proteases neutrofílicas, mas com atividade normal quanto a ROI, são capazes de resistir a infecções causadas por *Staphylococcus* sp *e Candida albicans.*

No modelo de *Leishmania* foi apontado o envolvimento de elastase neutrofílica na ativação de macrófagos e no efeito leishmanicida (Ribeiro-Gomes *et. al.,* 2004). Ao avaliarmos o efeito da elastase no nosso modelo, observamos que a adição exógena da mesma (0,2 µg/ml) é capaz de ativar macrófagos murinos em cultura, modificando sua morfologia e também diminuindo o número de parasitas na cultura após 7 dias. Nos nossos resultados, descartamos a hipótese de uma contaminação da elastase neutrofílica por LPS uma vez que a mesma foi submetida à cromatografia em coluna de polimixina.

Estudos recentes sugerem que neutrófilos de C57BL/6 expressam mais elastase (Ribeiro-Gomes, dados não publicados). Isso poderia explicar a presença de um número acentuado de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c infectados e sua susceptibilidade pela menor quantidade de elastase neutrofílica em comparação com C57BL/6, que apesar de migrarem menos neutrófilos, estes possuem mais elastase controlando a infecção. Além do fato de que, o maior número de neutrófilos na cavidade peritoneal encontrado nos animais BALB/c gera um maior número de células apoptóticas, o que favorece a infecção (Freire de Lima *et. al.,* 2000)

Nossos dados fortalecem a importância dos neutrófilos e seus produtos na modulação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e o possível envolvimento no perfil de susceptibilidade e resistência.

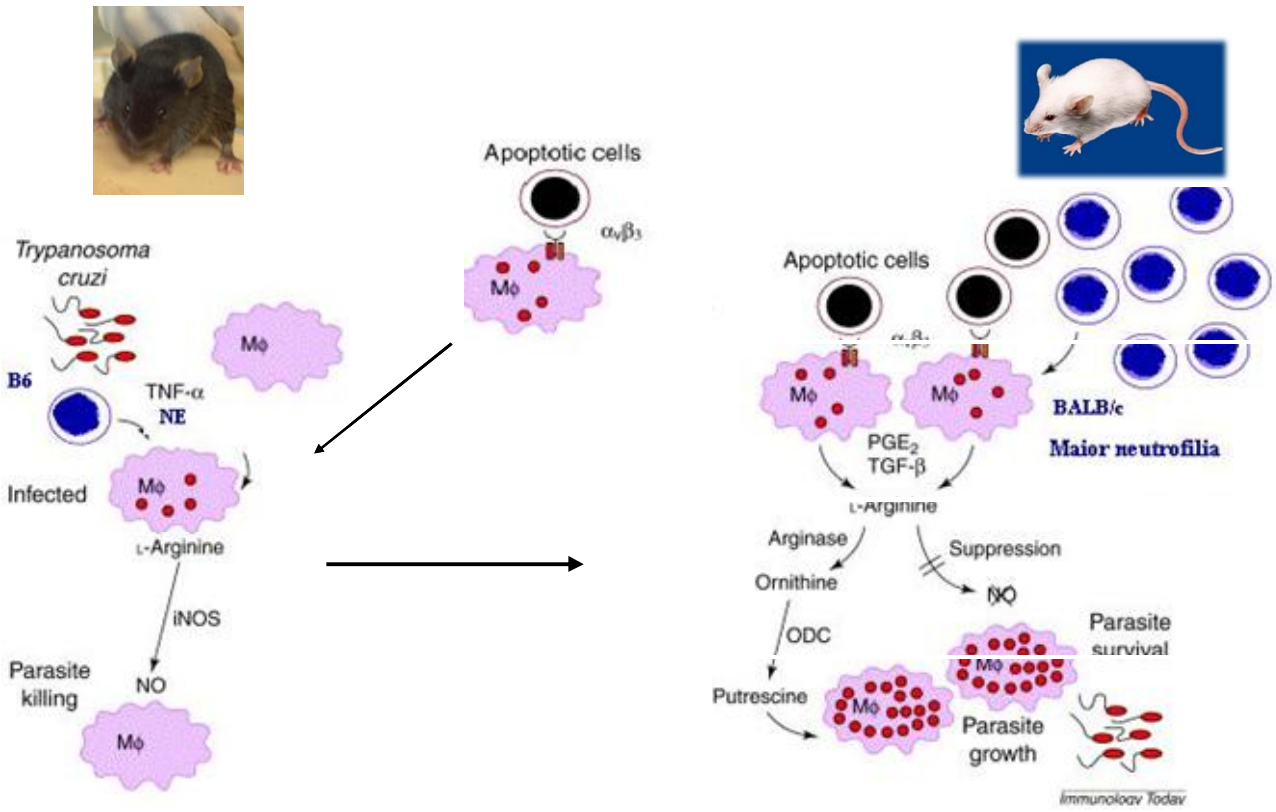


Figura 25: modelo proposto

Sugerimos que, o perfil de resistência dos animais C57BL/6 deve-se a uma maior produção de TNF-á e elastase neutrofílica, que proporciona uma maior ativação dos macrófagos que podem responder melhor a infecção com o aumento da produção de óxido nítrico. Em contrapartida, o perfil de susceptibilidade observado nos animais BALB/c é gerado por uma maior migração de neutrófilos para cavidade peritoneal desses animais, o que gera uma maior produção de mediadores antiinflamatórios como TGF-â e PGE_2 que favorecem ao crescimento do parasita.

Conclusões

- A interação de neutrófilos de C57BL/6 com macrófagos (BALB/c e C57BL/6) controla a replicação do *T.cruzi in vitro;*
- Neutrófilos viáveis de BALB/c e neutrófilos apoptóticos exarcebam a replicação *T.cruzi in vitro;*
- A presença de células apoptóticas reverte o efeito microbicida dos macrófagos estimulados por neutrófilos de C57BL/6 *in vitro*;
- O aumento da infecção na presença de neutrófilos de BALB/c é dirigido pela produção de TGF â e PGE_2;
- O controle da infecção obtido em co-culturas de macrófagos com neutrófilos de C57BL/6 é dependente de TNF á , NO e elastase neutrofílica;
- O Número de neutrófilos na cavidade peritoneal se mostrou maior nos animais BALB/c infectados em comparação com os camundongos C57BL/6, gerando um maior número de células apoptóticas no peritônio dos animais após 24 horas de infecção nos estudos *in vivo;*
- A interação de macrófagos com neutrófilos de C57BL/6 induz maior produção de TNFá no peritônio e TGF â , PGE_2 e IL-10 nos camundongos de BALB/c nas dosagens do exutado peritoneal.

Referências

ABEL L, DESSEIN AJ (1997). The impact of host genectis on susceptibility to humam infection diseases. Imunity. 9:509-516.

AGAE, KATSCHINSKI DM, ZANDBERGEN G., LAUFS H, HANSEN B, MULLER K, SOLBACH W, LASKAY T. (2002). Inibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by intracellular parasite *Leishmania major*. The journal of immunology, 169:898-905

ALLEN LAH. (2003). Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polimorphonuclear leukocytes. Microbes and infections, 5:1329-1335

ARMSTRONG RC, XIANG J (1996). Fas – indeced activation of cell death-related proteases inhibitors. J. Biol. Chem 271:16850-16859.

ANDRADE ZA (1991). Pathogenesis of Chagas disease. Res Immunol 142:126-9

ANDRADE V, BARRAL-NETO M, ANDRADE SG (1985). Patterns of resistence if inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasites strain. Braz J. Med Biol Res 18: 499-506.

ANDRADE ZA Andrade SG, Brener Z (1979). Patologia IN : *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Guanabara Koogan S.A Rio de Janeiro, primeira edição. 199-248.

ANDRADE ZA.(2000) Fisiopatogenia da doença de Chagas. Revista de Patologia Tropical , 29 (supl.): 131-140.

ADRIANO G. ROSSI (2005). Regulation of neutrophil apoptosis and removal apoptotic cells. Inflammation & Allergy, 4, 447-454.

APPELBERG R. (2007). Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. Trend. Microbiol; 15, 87-92

BELINDA H. TAN, CHISTOPH MEINKEN, MAX BASTIAN, HEIKO BRUNS, ANNALIZA LEGASPI, MARIA TEREZA OCHOA, STEPHAN R. KRUTZIK, BARRY R. BLOOM, TOMAS GANZ, ROBERT L. MODLIN AND STEFFEN STENGER (2006). Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. The journal of immunology, 177:1864-1871.

BIJOVSKY T, MILDER R (1988). Ultraestrutural analysis of the interaction between host cells and *Trypanosoma cruzi* in experimental chagoma. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 82: 704-708.

BOUVIER CA, GABBIANI G, MAJNO G. (1975). Proceedings: Binding of anti-actin auto-antibodies to platelets. Thromb Diath Haemorrh. 15;34(2):577.

BRENER Z, ANDRADE ZA, BARRAL-NETTO N (2000). *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Segunda edição, Ed. Guanabara Koogan S.A.

CAMPOS MA, GAZINELLI RT (2004).*Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized though Toll-like recptors. Mediators Inflamm. 13:139-143.

CARL NATHAN. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat Rev Immunol. 2006 Mar 6 (3):173-82. Review.

CHAGAS C. (1992). Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação de tripanozimiase americana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 15: 67-71

CHAGAS C (1924). Infection naturelle dês singes du Pará (Crysotrix sciureus) par *Trypanosoma cruzi.*C.R. Soc Biol (Paris) 90: 873-883.

CHARLES N. S. AND JOHN SAVILL(2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nature Review immunology 12: 1191-1196

CHEN. L, WATANABE T, WATANABE H, SENDO F (2001). Neutrophil depletion exarcerbates experimental Chagas Disease in Balb/c, but protects C57Bl/6 mice through modulating the Th1/Th2 dicotomy in differente directions. Eur. J. Immunol. 31:265-275.

CHRISTINE T.N. PHAM (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. Nature Immunology Review (6) July 2006

COX G (1996). Il-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. Am. J. Physiol. 271:566-570.

DEVANEY. (2003). Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. FEBS Lett. 2003 Jun 5;544(1-3):129-32.

DIBBERT B, WEBER M, NIKOLAIZIK WH, VOGT P, SCHONI MH, BLASER K, SIMON HU (1999). Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A. ;96(23):13330-5.

DOSREIS G.A. FREIRE DE LIMA C. G., NUNES P.N. LOPES F.M. (2005). The importance of aberrant T cells responses in Chagas disease. Trends in Parasitology. VOL. 21 (5):237-243.

ELLIS & BEAMAN. (2004). Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. Immunology. 2004 May;112(1):2-12. Review

FADOK VA, BRATTON DL, KONOWAL A, FREED PW, WESCOTT JY, HENSON P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit

proinflamatory cytokine production through autócrina/parácrina mechanisms involving TGF-â, PGE_2 and PAF. J. Clin Invest 101:890-901.

FADOK VA, BRANTON DL, GUTHRIE L, HENSON PM (2001). Diferencial effects of apoptotic versus lysed cells on macrophages production of cytokine: Role of proteases. The Jounar of Immunology , 166: 6847-6854

FAURSCHOU M, BORREGAARD N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes and Infection 5: 1317- 1327

FONSECA SG, ROMÃO PRT, FIGUEREDO F, MORAIS RH, LIMA HC, FERREIRA SH, CUNHA F. (2003). Tnf-a mediates the induction of nitric oxide syntase in macrophages but no in neutruphils in experimental cutaneus leishmaniasis. European Journal of immunology, 33: 2297-2306.

FREIRE-DE-LIMA C, NASCIMENTO DO, SOARES MBP, BOZZA PT, CASTRO-NETO H, MELLO FG, DOS REIS G, LOPES MF (2000). Uptake apoptotic cells drives the growth of pathogenic *Trypanosoma* in macrophages. Nature, 403: 199-203.

FREIRE-DELIMA C.G. , YI QUN XIAO, SHRA J, GARDAI, DONNA L., BRATTON, WILLIAM P. SCHIEMANN AND PETER M. HENSON (2006). Apoptotic cells, through transforming growth factor-â, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-imflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. JBC, October, 2006

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde 2006. www.funasa.gov.br.

GOMES NA, PREVIATO JO, ZINGALES B, MENDONCA-PREVIATO L, DOSREIS GA. Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from Trypanosoma cruzi. Assignment of the T cell-suppressive determinant to the ceramide domain. Immunol. 1996 Jan 15;156(2):628-35.

GRADI, C. E. CAVARRA, P CALZONI, P. MARCOLONGO, M. DE SANTI, P. A. MARTORANA, AND G. LUNGARELLA GRADI, C (1994). Neutrophil lysosomal dysfunctions in mutant C57BL/6J mice: interstrain variations in content of lysosomal elastase, catepsin G and their inhibitors. Biochem. J. 299:237.

HANA PC, ACOSTA D, COLLIER (1993). On the role of macrophages in antrax. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 90. 21:10198-10201.

HANS-UWE SIMON (2003). Neutrophil apoptosis and their modification in inflammation. Immunological reviews 193:101-110.

HAREL-BELLAN, A., JOSKOWICZ, M., FRADELIZI, D. AND EISEN, H. (1983). Modification of T cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected whith *Trypanosoma cruzi.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 3466

HENGARTNER MO, HORVITZ HR. (1994). The ins and outs of programmed cell death during C. elegans development. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 30;345(1313):243-6. Review.

HENGATNER MO (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature 407 (6805): 770-776.

HIROYUKI MORIUCHI, MASARO MORIUCHI AND ANTHONY S. FAUCI (2000). Cathepsin G , a neutrophil deived serine protease, increase susceptibility of macrophages to acute human immunodeficiency virus type 1 infection. Journal of virology. 74: 6849-6855.

HOLF DF, LYNCH RG, KIRCHOHOFF LV (1993). Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistance and susceptible mice during infection which *Trypanosoma cruzi*. J. Imminol 151:703-707.

ISHIHARA K, YAMAGUCHI Y, OKABE K, OGAWA M (1999). Neutrophil Elastase enhanced macrophage production of chemokines in recptor-mediated reaction. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol, 103:139

INIESTA V, GOMEZ-NIETO LC, CORRALIZA I.(2001). The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-l-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. J Exp Med. 19;193(6):777-84.

INIESTA. (2002). Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites. Parasite Immunol. 2002 Mar;24(3):113-8.

JAFFRAY C, MENDEZ C, DENHAM W, CARTER G. NORMAN J (2000). Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor-a : role of nuclear factor êB proteins. Journal Gastrointest. Sur., 4: 370

LASKAY (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? Trends Microbiol. 2003 May;11(5):210-4.

LIMA C, PERINI A, GARCIA ML, MARTINS MA, TEIXEIRA MM, MACEDO MS. (2002). Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (Ascaris suum) extract in a murine model of asthma. Clin Exp Allergy. 32(11):1659-66.

LIU, Z., S. D. SHAPIRO, X. ZHOU, S.S. TWINING, R. M. SENIOR, G. J. GIUDICE, J. A. FAIRLEY, AND L. A. DIAZ (2000). A critical role neutrophil Elastase in experimental bullous pemphigoid. J. Cin Invest. 105:113

KIERSZENBAUM, F., CUNA, W.R., BELTZ, L.A. AND SZTEIN, M. B. 1990. Tyipanosomal immunosuppressive factor: a secretion products of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. J. Immunol., 144:4000-4004.

KIERSZENBAUM, F., MORETTI, E. AND SZTEIN, M.B. (1991). *Trypanosoma cruzi* induces suppression of DNA synthesis and inhibits expression of interleukin-2 receptor by stimulated human lymphocytes B. Immunol., 74:317-322

KERT JFR, WYLLIE AH, CURIE AH (1972). Apoptosis a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26 (4): 239-247.

KOBERLE F (1968). Chagas disease and Chagas Syndromes: the patology of American trypanosomiasis. Adv. Parasitology 6: 63-116.

KOCHI SK, COLLIER RJ. (1993). DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. Exp Cell Res; 208(1):296-302.

KRAMER PH. (2000). CD95's deadly in immune system. Nature, 407 (6805): 789-795.

KUDO C, YAMASHITA T, TERASHITA M, SENDO F (1993). Modulation of in vivo immune response by depletion of neutrophils using a monoclonal antobody, RP-3 II. Inibition by RP-3 treatment of mononuclear leucocyte recruitement in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in rats. J. Immunol. 150 (9): 3739-3746

VAN ZANDBERGEN G, KLINGER M, MUELLER A, DANNEENBERG S, GEBERT, SOLBACH W, LASKAY T. (2004). Neuthophil granulocyte serves as a vector for *Leishmnania* entry into macrophages. The Journal of Immunology, 173:6521-6525.

LEE WL, DOWNEY GP (2001). Leukocyte Elastase: physiological function and role in acute lung injury. Am. Respir. Crit. Care Med, 164:896

LIEW FY, LI Y, MILLOT S. (1990). Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leismaniasis. Journal Experimental Medicine, 170: 2097.

LIMA RG, VAN WEYENBERGH J, SARAIVA EM, BARRAL-NETTO M, GALVAO-CASTRO B, BOU-HABIB DC. (2002). The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. J Infect Dis.1;185(11):1561-6.

LIMIN ZHENG, MIN HE, MIN LONG, ROBERT BLOMGRAN AND OLLE STENDAH (2004). Pathogen – Induced apoptotic neutrophils express heat shock proteins and elicit activation of human macrophages. The journal of immunology. 173: 6319-6326.

LAURENCE J.(2002). Changes in HIV-related diseases and the future of HIV medical care.AIDS Read. 12(7):283, 287.

LENARDO M, CHAN KM, HORMUNG F, MCFALAND H, SIEGEL R, WANG J, ZHENG L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. Annu. Rev. Immunol, 17:221-253.

LEY K. (2002). Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. Immunol Rev. 186:8-18.

LOPES MF, FREIRE-DE-LIMA CG, DOS REIS GA (2000). The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. Immunology Today, 21 (10): 489-494.

LOPES M.F., VEIGA VF, SANTOS, AR, FONSECA MEF, DOS REIS GA (1995). Activation-induced $CD4^+$ T cell death by apoptosis in experimental Chagas disease. J. Immunol. 154:774-756.

LOWENSTEIN, C. J. & SNYDER, S. H. 1998. Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell, 70: 705

MAJUMDER, S. AND KIERSZENBAUM, F. (1996). Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*- induced downregulation of lymphocyte function: inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor ã (p64 IL-2R) and (p70 IL-2R) chain molecules in activation normal human lymphocytes. J.Immunol., 156: 3866-3874

MARTINS, G. A.; CARDOSO, M. A.;ALBIERI, J. C. & SILVA, J.S. (1998). Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Immunol. Lett., 63: 113

MAURO CORTEZ, MARCELO R. SILVA, IVAN NEIRA, DANIELE FERREIRA, GISELA R. S. SASSO, ALEJANDRO º LUQUETTI, ANIS RASSI AND NOBUKO YOSHIDA(2005). *Trypanossoma cruzi* surface molecule gp90 dowregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. Microbes and Infection 8:36-44.

MAZZA S, JORG ME. & CANAL FEIJÓO EJ (1938). Primer caso crônico mortal de forma cardíaca de enfermedad de Chagas demonstrado em Santiago del Estero. Publicación de la Missión de Estudos de Patologia Regional Argntina 38:1-75.

MEDZHTOV R & PASARE C (2004). Toll-like receptors and acdquired immunity. Semin Imminol. 16:23-26.

MICHELIN MA, SILVA JS, CUNHA FQ. (2005). Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Exp Parasitol. 111(2):71-9.

MIZUKI HIRATA, TATSURU HARA, MASAYOSHI KAGE,TOSHIHIDE FUKUMA AND FUJIRO SENDO (2002). Neutropenia augments experimentally induced Schistosoma japonicum egg granuloma formation in CBA mice, but not in C57BL/6 mice. Parasite Immunology, 24, 479-488

NATHAN C. (2006). Neutropils and immunity challenges and opportunities. Nature Reviews Immunology 6: 173-182.

NOGUEIRA N, ELLIS J, CHAPLAN S, COHN Z.(1981). *Trypanosoma cruzi*: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. Exp Parasitol. ;51(3):325-34.

NUNES, M. P., R. M. ANDRADE, M.F. LOPES AND G. A. DOSREIS (1998). Activation induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected host. J. Immunol. 160:1313

OLIVEIRA AC, PEIXOTO JR, DE ARRUDA LB, CAMPOS MA, GAZZINELLI RT, GOLENBOCK DT, AKIRA S, PREVIATO JO, MENDONCA-PREVIATO L, NOBREGA A, BELLIO M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. J Immunol. 2004 Nov 1;173(9):5688-96.

PAKIANATHAN, D.R. AND KUHN, R. (1992). Interleukin-2 receptors in experimental Chagas disease. Infect. Immun., 60: 3904-3908

PALMBLAD J, PAPADAKI HA, ELIOPOULOS G (2001). Acute and chonic neutropenias. What is new? J. Inter Medicine Review 250:476-491

PINHEIRO-DA-SILVA F, CHIAMOLERA M, CHARLES N, KANAMARU Y, VELASCO IT, BENHAMOU M, MONTEIRO RC. B lymphocytes undergo apoptosis

because of FcgammaRIIb stress response to infection: a novel mechanism of cell death in sepsis. Bichat Medical School, INSERM U699, 75870 Paris, France.

PINTO AY, HARADA GS, VALENTE VD, ABUD JE, GOMES FD, SOUZA GC, VALENTE AS. (2001).Cardiac attacks in patients with acute Chagas disease in a family micro-outbreak, in Abaetetuba, Brazilian Amazon Rev Soc Bras Med Trop. 34(5):413-9.

PRATA A (1994). Chagas Disease. Infect Dis Clin North Am. 8: 61-76.

PONGRACZ J, WEBB P, WANG K, DEACON E, LUNN OJ, LORD JM. (1999) Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C-delta. J Biol Chem. 1999 Dec 24;274(52):37329-34.

RACHEL LEWINSHN (2005). Do caldo de cana ao açaí I. Jornal da Unicamp. Edição: 283

RACHEL LEWINSHN (2005). Do caldo de cana ao açaí II. Jornal da Unicamp. Edição: 287.

REY L. (2000). Bases da parasitologia médica. Segunda edição, ed. Guanabara Koogan S.A.

RIBEIRO-GOMES F, OTERO AC, GOMES NA, MONIZ-DE-SOUZA MCA, FINKELSTEIN LC, ARNHODT AC, CALICH VL, COUTINHO SG, LOPES MF, DOS REIS GA (2004). Macrophage interaction with neutrophils regulate Lishmania major infection. The Journal of Immunology, 145:4305-4310.

RIBEIRO-GOMES F. L. , SILVA M.T. AND DOSREIS A. (2006). Neutrophils, apoptosis and phagocytic clearance: na innate sequence of cellular responses regulating intramacrophagic parasite infections. Parasitology 132:61-68

RITER, D.M. AND KUHN, R.E. (1990) Antigen –specific T-helper cells abrogate suppression in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. Infec. Immun., 58: 3248-3256.

ROGGERO E, PEREZ A, TAMAE-KAKAZU M, PIAZZON I, NEPOMNASCHY I WIETZERBIN J, SERRA E, REVELLI S, BOTTASSO O (2002). Differencial susceptibility acute *Trypanosoma cruzi* infection in Balb/c and C57Bl/6 mice is not associated with a distinct parasite load cytokine abnormalities. Clin Exp. Immunol 128 (3) :421-425.

ROTTENBERG, M. E., CARDONI, R. L., ANDERSSON, R., SEGURS, E. D. AND ORN, A (1998). Resistance to *Trypanosoma cruzi* requires T helper/ inducer cells as well as natural Killer cells. Scand. J. Immunol., 28: 573-582.

REED S.G. (1988) in Liew F. Y. , COX FEG (eds): Immunology f intracellular parasitism. Chem Immunol. Basel, Karger, 1998. Vol 70 pp 124-143

REAVES TA, COLGAN SP, SELVARAJ P, POCHET MM, WALSH S, NUSRAT A, LIANG TW, MADARA JL, PARKOS CA.(2001) Neutrophil transepithelial migration: regulation at the apical epithelial surface by Fc-mediated events.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. ;280(4):G746-54.

ROMANA C (1943). Contribuição ao conhecimento da patogenia de Tripanosomiasis americana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 39:253-264.

RUSSO M. (1989). Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic of T. *cruzi*. Parasite immunology.

WWW.SAÚDE.GOV.BR

SAVILL J, HASLETT C (1995). Granulocytes clearance by apoptosis in the resolution of apoptosis. Semin. Cell Biology, 166: 6847-6854.

SALOMON B. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. Anne Rev Immunol. 2001; 19:225-52..

SAVILL J, FADOK V (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature, 407: 784-788.

SERHAN C. N. & SAVILL J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. Nature Immunology review, 12: 1191-1196

SHODA LK, KEGERREIS KA, SUAREZ CE, RODITI I, CORRAL RS, BERTOT GM, NORIMINE J, BROWN WC. (2001). DNA from protozoan parasites Babesia bovis, *Trypanosoma cruzi*, and T. brucei is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. Infect Immun. 2001 Apr;69(4):2162-71.

SILVA JS, MORRISEY PJ, GRABSTEIN KM, ANDERSON D, REED SG (1992). Interleucin 10 and interferon y regulation of experimental of *Trypanosoma cruzi* infection.
J. Exp. Med 175: 169-174.

SOONG, L. TARLETON, R.L. (1994). *Trypanosoma cruzi* infection suppresses uclear factors that bind to specific sites on the interleukin-2 enhacer. Eur.J.Immunol., 24:16-23.

SPEER CP, PABST MJ, HEDEGAAD HB, REST RF, JOHNSTON JR RB (1984). Enhanced release of oxygen metabolities by monocyte-derived macrophage exposed to

proteolytic enzymes: activity of neutrophils Elastase and catepsin G. The journal of Immunology, 133: 2151.

SRASSER A, O'CONNOR L, DIXIT VM (2000). Apoptosis signaling. Annu. Rev. Biochem, 69: 217-245.

STUEHR DJ, KWON NS, GROSS SS, THIEL BA, LEVI R, NATHAN CF. (1989). Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. Biochem Biophys Res Commun. 15;161(2):420-6.

SUSAN K. BLISS, L. CRISTINA GAVRILESCU, ANA ALCARAZ AND ERIC Y. DENKERS (2001). Neutrophils depletion during *Toxoplasma gonddi* infection leads to impaired Immunity and lethal systemic pathology. Infection and Immunity, 69: 4898-4905.

TACCHINI-COTTIER F, ZWEIFEL C, BELKAID Y, MUKANKUNDIYE C, VASEI M, LAUNOIS P, MILON G, LOUIS JA. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with Leishmania major. J Immunol. 2000 Sep 1;165(5):2628-36.

TARLETON, R. L. (1988). Tumor necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas disease. Clin. Exp. Immunol.., 73: 186-190

TARLETON, R. L. and kuhn, r.e, (1984). Restoration of *in vitro* immune response of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing interleukin-2. J. Immuol., 133:1570-1575.

THORNBERRY NA, RANO TA, PETERSON EP, RASPER DM, TIMKEY T, GARCIA-CALVO M, HOUTZAGER VM, NORDSTROM PA, ROY S, VAILLANCOURT JP, CHAPMAN KT, NICHOLSON DW(1997).. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis.J Biol Chem. 18; 272(29):17907-11.

THORNBERRY NA.(1997) The caspase family of cysteine proteases.
Br Med Bull. 53(3):478-90. Review.

THORNBERRY NA, ROSEN A, NICHOLSON DW. Control of apoptosis by proteases.(1997)Adv Pharmacol. 41:155-77. Review

TYLER KM, ENGMAN DM (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 31 (5-6): 472-81.

TSUJIMOTO Y, COSSMAN J, JAFFE E, CROCE C (1985). Involviment of the Bcl-2 gene in human follicular lynfoma. Science 228 (4706): 1440-1443.

VAN ZANDBERGEN G, KLINGER M, MUELLER A, DANNENBERG S, GEBERT A, SOLBACH W, LASKAY T. (2004)Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages.J Immunol. ;173(11):6521-5.

VAN ZANDBERGEN G. SOLBACH W, LASKAY T. (2007). Apoptosis driven infection.
Autoimmunity 4:349-52

VOLL RE, HERMANN M, ROTH EA, SACH C, KALDEN JR, GIRKONTAITE I (1997). Immunosupressive effects of apoptotic cells. Nature, 405: 350-351.

WATSON RW, COFFEY R, O'NEILL A, FITZPATRICK JM. (1999). Caspase protease manipulation: a novel approach to apoptotic induction in prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. ;2(S3):S34

W.H.O – World Health Organization 2005. Health topics: Chagas disease. www.who.inf

WIKIPEDIA, 2007

YAMAMOTO K, SASSADA M (1999). Neutrophils function. Jap J Clin Med. 57:524-526.

ZAMBONI DS, RABINOVICH M (2004). Phagocytosis of apoptotic cells increase the susceptibility of macrophages to infection *Coxiella burnetti* phase II trough down modulation of nitric oxide production. Infection and Immunity, 72 (4) :2075-2080.

ZYCHLINSKY A, SANSONETI P (1997). Apoptosis in bacterial pathogenesis. J Clin Invest 100: 563-571.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

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