

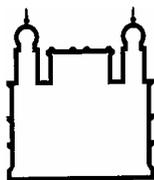
Bernardo Simões Franklin

Dissertação de Mestrado

*Correlação do fenótipo de resistência
do Trypanosoma cruzi a drogas
com o mecanismo de escape à ação
antimicrobiana de IFN- γ em
fibroblastos humanos*

Belo Horizonte

Junho de 2005



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular

Correlação do fenótipo de resistência do
Trypanosoma cruzi a drogas com o mecanismo de
escape à ação antimicrobiana do IFN- γ em
fibroblastos humanos.

por

Bernardo Simões Franklin

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de Mestre em Ciências, sub-área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Alvaro José Romanha
Co-orientadora: Dra. Silvane Maria Fonseca Murta
Co-orientadora: Dra. Andréa Carla Leite Chaves

Belo Horizonte - MG
Junho de 2005

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular

Esta dissertação intitulada:

Correlação do fenótipo de resistência do *Trypanosoma cruzi* a drogas com o mecanismo de escape à ação antimicrobiana do IFN- γ em fibroblastos humanos.

Apresentada por

Bernardo Simões Franklin

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. Alvaro José Romanha – Centro de pesquisas René Rachou / FIOCRUZ (Orientador)

Dra. Luzia Helena Carvalho - Centro de pesquisas René Rachou / FIOCRUZ (Membro titular)

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva – Universidade Federal de Minas Gerais (Membro Titular)

Dra. Walderez Ornelas Dutra – Universidade Federal de Minas Gerais (Membro Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em 09 de junho de 2005.

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR

F831c
2005

Franklin, Bernardo Simões.

Correlação do fenótipo de resistência do Trypanosoma cruzi a drogas com o mecanismo de escape à ação antimicrobiana do IFN- γ em fibroblastos humanos / Bernardo Simões Franklin. – Belo Horizonte : Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisa René Rachou, 2005.

xi, 82 f.: il; 29,7 x 21,0 cm.

Bibliografia: f. 76 - 82

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação do Centro de Pesquisa René Rachou.

1. Trypanosoma cruzi 2 Resistência a drogas 3. Mecanismos de escape I. Título. II. Romanha, Álvaro José (Orientador); III. Murta, Silvane Maria Fonseca (Co-orientadora); IV. Chaves, Andréa Carla Leite (Co-orientadora)

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Epígrafe

Faça da interrupção um novo caminho, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro... Não paute sua vida nem sua carreira pelo dinheiro. Ame seu ofício com todo o coração. Persiga fazer o melhor. Seja fascinado pelo realizar, que o dinheiro vira como consequência. Pense no seu país, porque principalmente hoje pensar em todos é a melhor maneira de pensar em si... Fomos criados para construir pirâmides e versos, descobrir continentes e mundos e caminhar sempre com um saco de interrogações na mão e uma caixa de possibilidades na outra... Trabalhe em algo que você realmente goste e você nunca precisará trabalhar na vida.

Nizan Guanaes

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Álvaro José Romanha pela oportunidade de trabalho, orientação, apoio e pelas inúmeras lições de vida;

A Dra. Andréa Carla pela amizade, co-orientação, conselhos e sugestões;

À Dra. Silvane Maria Fonseca Murta pela amizade, co-orientação, dedicação, paciência, e pelo seu apoio nas fases difíceis;

A Dra. Catherine Maryveite Ropert pela amizade, brilhantes sugestões e suporte sempre que precisei;

À Thais Carneiro de Lourdes pela amizade e ajuda nos experimentos de Western Blot;

À Maureen Rodarte pela amizade, carinho e pela indispensável e constante ajuda;

A Rosana Alves pela amizade, apoio e pelo empenho em nos prover um ótimo ambiente de trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou em especial a Marcela, Marcilene, Nilton, Núbia e Sara pelos ótimos momentos de convivência;

Ao pessoal dos laboratórios de Imunologia e Malária do CPqRR, pelo apoio e disponibilidade sempre quando solicitados;

Aos colegas da pós-graduação pela amizade, consideração, pelas longas conversas na cantina e pelo excelente convívio que tivemos durante o período que cursamos as disciplinas;

Ao Segemar pelo agradável convívio na biblioteca e pelo empenho em conseguir os artigos que solicitei;

Ao Roberto Sena Rocha e ao Centro de pesquisas René Rachou pelo auxílio financeiro, e a estrutura para a realização deste trabalho;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos;

À Dra. Luzia Helena de Carvalho pela amizade, apoio e por integrar a banca avaliadora desta dissertação;

Dr. Aristóbolo Mendes da Silva pelo excelente convívio, pelos conselhos, pela sua invejável cortesia e disposição para ajudar sempre que precisei e por integrar a banca avaliadora desta dissertação;

A Dra. Walderez Ornelas Druetra por aceitar o convite para integrar a banca avaliadora desta dissertação;

Aos amigos do Izabela Hendrix, Lelê, Perini, Oto, Preto, Robô e Chamone pela paciência, acolhida e pelos maravilhosos momentos compartilhados;

Aos meus familiares, minha mãe Eliana, meu pai Adail e meus irmãos Carla e Henrique pelo amor, carinho e incentivo durante toda a minha vida;

A Gina pelo carinho, paciência nos períodos difíceis, companheirismo, dedicação e por sempre acreditar em mim e me incentivar a prosseguir.

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema do primeiro passo do metabolismo do aminoácido triptofano	20
Figura 2	Esquema da via de transdução de sinal ativada por IFN- γ .	23
Figura 3	Distribuição mundial da Doença de Chagas	26
Figura 4	RT-PCR dos genes da IDO, IRF-1, IRF-2 e da GAPDH	47
Figura 5	Amplificação dos genes da IDO e da GAPDH por qPCR.	49
Figura 6	Amplificação do cDNA dos genes IRF-1 e GAPDH por qPCR.	51
Figura 7	Amplificação do cDNA dos genes IRF-2 e GAPDH por qPCR.	53
Figura 9	Seqüência de aminoácidos da proteína tirosina-fosfatase de <i>T. cruzi</i> .	55
Figura 10	Seqüência do domínio catalítico da proteína tirosina-fosfatase de <i>T. cruzi</i> .	55
Figura 11	RT-PCR do gene TcPTP	56
Figura 12	Amplificação do cDNA dos genes TcPTP e GAPDH por qPCR.	58
Figura 13	Amplificação do cDNA dos genes TcPTP e HGPRT por qPCR.	60

Lista de Tabelas

Tabela 1	Iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR e qPCR	41
Tabela 2	Determinação do IC ₅₀ das populações BZS e BZR de <i>T. cruzi</i> após 8 passagens sucessivas em cultura de fibroblastos humanos 2C4 na presença de diferentes concentrações de BZ.	46
Tabela 3	Resumo dos resultados da expressão do mRNA obtidos com a técnica qPCR nos fibroblastos humanos 2C4	70

Abreviaturas

BZS	População de <i>T. cruzi</i> sensível ao Benzonidazol
BZR	População de <i>T. cruzi</i> com resistência induzida ao Benzonidazol
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CMV	Citomegalovírus
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	2'-deoxinucleotídeos-5'-trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
EMCV	Vírus da encefalomiocardite
γ	Gama
g	Força da gravidade
GAF	Fator de ativação transcricional do IFN-γ (<i>Gamma activated factor</i>)
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GAS	Sítio de ativação do interferon no DNA (<i>Gamma activated site</i>)
HEPES	(N-[2-hidroxietil] piperazina- N'-[ácido etanosulfônico])
HLADR-β	Antígeno leucocitário humano
IFN	Interferon
IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gamma
IFN-γR1	Receptor de IFN-γ subunidade 1
IFN-γR2	Receptor de IFN-γ subunidade 2
IL-12	Interleucina 12
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
iNOS	Óxido nítrico sintase Indutível
ISRE	Elemento de resposta estimulado pelo IFN-γ
IRFs	Fatores reguladores de IFN
IRF-1	Fator regulador de IFN 1
IRF-2	Fator regulador de IFN 2
ISGs	Genes estimulados por IFN
JAK	Tirosina quinase da família Janus
KCl	Cloreto de potássio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
min	Minutos
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro

NaOH	Hidróxido de sódio
NFX	Nifurtimox
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PTP	Proteína tirosina quinase
PTP	Proteína tirosina fosfatase
qPCR	PCR quantitativo em tempo real (<i>Real Time Quantitative Reverse Transcriptase PCR</i>)
rIFN-γ	Interferon gama recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase após transcriptase reversa
SBF	Soro bovino fetal
SHP-1	Proteína tirosina-fosfatase que contém um domínio SH2 (<i>SH2 domain-containing SHP-1 tyrosine phosphatase</i>)
STAT	Proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
TBE	Tampão Tris-borato/EDTA
TcPTP	Proteína tirosina-fosfatase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Th1	Subpopulação de Linfócitos T auxiliares 1
Th2	Subpopulação de linfócitos T auxiliares 2
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TYR	Tirosina
U	Unidades

Abstract

The main problems of Chagas disease chemotherapy are the low efficacy of nifurtimox and benznidazole (BZ), their toxicity and the existence of naturally drug-resistant *T. cruzi* strains. In the present study we have investigated if the drug-resistance phenotype in *T. cruzi* is associated with the modulation of interferon-gamma (IFN- γ) mediated response, one of the most important immune responses against parasitic infections. The major IFN- γ mediated response in human fibroblasts is the induction of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) expression which results in the degradation of the essential amino acid tryptophan. The IFN- γ signaling pathway is regulated by protein tyrosine-phosphatases (PTPs) as well as by the IRF family of transcription factors. In this study we have used a *T. cruzi* BZ resistant population (BZR) selected *in vivo* which has shown to be 2-fold more resistant than its susceptible counterpart (BZS) in our *in vitro* BZ susceptibility assay. To investigate the possible mechanisms accounting for the impaired responses to IFN- γ used by these populations, we have quantified by Real Time Reverse Transcriptase PCR, the mRNA expression of IDO, IRF-1, IRF-2 genes in human fibroblast infected with *T. cruzi* populations followed by rIFN- γ stimulation. Our results showed that the infection of fibroblasts with the BZS population reduced the IDO mRNA expression. Nevertheless, the infection of fibroblasts with the BZR population has not only reduced the IDO but also the IRF-1 mRNA expression. Moreover, infection of cells with the resistant population has also raised IRF-2 mRNA expression. IFN- γ stimulation of BZS or BZR infected fibroblasts caused no effect in the *T. cruzi* protein tyrosine phosphatase (TcPTP) mRNA expression. Altogether, our results show that drug-resistant parasites present a higher evasive potential against the IFN- γ mediated response as compared to susceptible ones, suggesting a correlation between the *T. cruzi* drug-resistance phenotype and the subversion of IFN- γ mediated response in human fibroblasts.

Resumo

Os maiores problemas da quimioterapia da doença de Chagas são a baixa eficácia e alta do nifurtimox e benznidazol (BZ) sua toxicidade e a existência de cepas naturalmente resistentes. Neste trabalho investigamos se o fenótipo de resistência a drogas de populações de *Trypanosoma cruzi* poderia estar relacionado com a inibição da resposta mediada pelo Interferon-gamma (IFN- γ), a principal citocina envolvida nas respostas imunológicas contra infecções virais e parasitárias. Em fibroblastos humanos, o efeito antimicrobiano exercido pelo IFN γ é a degradação do aminoácido essencial triptofano através da indução da indoleamina-2,3dioxigenase (IDO). A via de sinalização do IFN- γ é regulada por proteínas tirosina-fosfatases (PTPs) e pelos fatores reguladores de IFN (IRFs) que se ligam a sítios de ligação nos promotores de muitos genes induzidos por IFN- γ (ISGs). Neste estudo foram utilizadas populações da cepa Y de *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao BZ (BZR) que se mostraram duas vezes mais resistentes do que seu par sensível (BZS) em nosso ensaio de susceptibilidade ao BZ (IC₅₀) *in vitro*. Para investigarmos os possíveis mecanismos utilizados por estas populações para bloquear a resposta mediada pelo IFN- γ , nós avaliamos através de RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR) a expressão do mRNA dos genes que codificam a IDO, os fatores IRF-1 e IRF-2 em fibroblastos humanos 2C4 infectados com estas populações e estimulados com rIFN- γ . Nossos resultados mostraram que a infecção com parasitos sensíveis causou uma redução da expressão do mRNA da IDO. Entretanto, a infecção das células com parasitos resistentes causou não somente uma redução na expressão do mRNA da IDO, mas também do IRF-1 e um aumento da expressão do mRNA do IRF-2. A estimulação com rIFN- γ dos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR não causou alterações na expressão da TcPTP. Nossos resultados mostram que parasitos resistentes possuem um maior potencial evasivo à resposta mediada pelo rIFN- γ comparado com os parasitos sensíveis, sugerindo uma correlação entre o fenótipo de resistência de *T. cruzi* a drogas e o mecanismo de escape do parasito à ação antimicrobiana induzida por esta citocina.

Sumário

Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	IX
Abreviaturas	X
Abstract	XII
Resumo	XIII
Introdução	17
1. Imunidade a patógenos intracelulares	17
1.1 - Os Interferons	18
1.1.2 - Mecanismos antimicrobianos e/ou microbiostáticos ativados por IFN- γ .	19
1.1.3 - Degradação do triptofano	20
1.1.4 – As vias de transdução de sinal de citocinas	21
1.1.5 – A via de transdução de sinal do IFN- γ	22
1.1.6 - Os fatores de transcrição ativados por IFN- γ	24
2. Mecanismos de evasão de patógenos intracelulares à resposta mediada por IFN- γ	24
3. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	26
JUSTIFICATIVA	32
OBJETIVOS	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
1. Linhagem celular	37
2. Cultivo celular	37
3. Citocinas	37
4. Parasitos	37
4.1. Manutenção dos parasitos em cultura de fibroblastos.	38
5. Fármaco utilizado	38
6. Susceptibilidade in vitro (IC50) das populações do <i>T. cruzi</i> ao Benzonidazol	38
7. Busca de seqüências e desenho de iniciadores	39
8. Estudo da expressão de genes	39
8.1 – Extração do RNA total e síntese do cDNA	40

8.2 – RT-PCR	41
8.2.1 – Quantificação da expressão gênica	41
8.3. Análise quantitativa dos genes	42
8.3.1. Clonagem dos genes	42
8.3.2 – RT-PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)	42
9. Análises estatísticas	43
RESULTADOS	45
1. Estabilidade do fenótipo de resistência ao Benzonidazol	45
2. Análise da expressão do mRNA de genes induzidos por IFN- γ	47
2.1. Avaliação da qualidade do cDNA e especificidade dos iniciadores por RT-PCR.	47
2.2 – Avaliação da expressão do mRNA da IDO	48
2.3 – Avaliação da expressão do mRNA dos fatores reguladores de IFN- γ (IRFs)	50
2.3.1 – Avaliação da expressão do mRNA do IRF-1	50
2.3.2 – Avaliação da expressão do mRNA do IRF-2	52
3 – Busca por proteínas tirosina-fosfatases (PTPs) de <i>T. cruzi</i> e de fibroblastos humanos	54
3.1 – Proteína tirosina-fosfatase de fibroblastos	54
3.1 – Proteína tirosina-fosfatase de <i>T. cruzi</i> .	55
5 – Avaliação da expressão do mRNA da TcPTP	56
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Introdução

1 - Imunidade a patógenos intracelulares

As doenças infecciosas e parasitárias são responsáveis, atualmente, por cerca de um terço de todos os óbitos humanos no mundo, um número maior do que o das mortes provocadas por todos os diferentes tipos de câncer combinados (Alberts, 2002). Elas são causadas por patógenos, grupo que inclui bactérias, fungos, protozoários, helmintos, vírus e mesmo proteínas infecciosas denominadas príons. Os patógenos de qualquer tipo devem possuir mecanismos para penetrar em seus hospedeiros e evitar sua imediata destruição pelo sistema imune. Para isso, eles desenvolveram mecanismos especializados para quebrar as barreiras celulares e bioquímicas e induzir respostas específicas no organismo parasitado.

As respostas do sistema imune inato são a primeira linha de defesa contra os patógenos invasores sendo também necessárias para o início das respostas imunes adaptativas específicas. As células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos e células dendríticas) são capazes de reconhecer moléculas conservadas de patógenos que não estão presentes na constituição do hospedeiro, incluindo muitos tipos de moléculas microbianas de superfície e o RNA de dupla fita de alguns vírus. Muitas dessas moléculas específicas de patógenos são reconhecidas por proteínas receptoras encontradas na superfície de macrófagos (Medzhitov & Janeway, 2000).

O reconhecimento de moléculas específicas de patógenos pelos macrófagos, resulta na fagocitose e na eventual destruição desses microrganismos por enzimas lisossomais, espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, além de mecanismos de depleção de nutrientes. Esse reconhecimento também ativa o sistema do complemento, um grupo de proteínas séricas que atuam em conjunto no rompimento da membrana do microrganismo e/ou sinalizam esse microrganismo para ser fagocitado por macrófagos e neutrófilos além de produzirem uma resposta inflamatória. As células fagocíticas também secretam moléculas sinalizadoras denominadas citocinas, que iniciam uma resposta inflamatória e ativam a resposta imune adaptativa (Medzhitov & Janeway, 2000). As citocinas iniciam a sua ação pela ligação a receptores específicos na superfície das células-alvo levando à expressão de genes específicos (Ária et al., 1990).

A eliminação bem sucedida de patógenos intracelulares geralmente requer a participação de células do sistema imune e citocinas características de uma resposta do tipo celular mediada por linfócitos T *helper* 1 (Th1) (Jankovic et al., 2001). Esta resposta é

caracterizada por uma grande atividade citolítica celular, ativação dos mecanismos microbicidas das células *Natural Killer* (NK), dos linfócitos T citotóxicos, dos macrófagos e pela produção de citocinas incluindo Interleucina 12 (IL-12), Interferon-gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (Romagnani, 1992).

A IL-12, secretada por macrófagos e células dendríticas, desempenha um papel fundamental na inflamação e na imunidade adquirida sendo também requerida para o desenvolvimento das respostas Th1 e para a eliminação de patógenos intracelulares. Ela é uma potente indutora da secreção de Interferon-gamma (IFN γ) por células T e NK (Wolf et al., 1991). Vários estudos têm demonstrado o papel da IL-12 na imunidade contra uma série de patógenos intracelulares incluindo *Leishmania major* (Heinzel et al., 1993), *Listeria monocytogenes* (Hsieh et al., 1993), *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli et al., 1994), *Mycobacterium tuberculosis* (Cooper et al., 1995) e *Trypanosoma cruzi* (Michailowsky et al., 1998).

1.1 - Os Interferons

Os Interferons (IFNs) são uma família de citocinas que desempenham um papel central na resistência do hospedeiro a patógenos. Os IFNs do Tipo I (IFN- α e IFN- β) são secretados por células infectadas por vírus. O Interferon-gamma (IFN- γ) é uma citocina pertencente à classe do Interferon do tipo II produzida primariamente por células T auxiliares do subtipo Th1 ativadas, células NK e células T citotóxicas do fenótipo 1 em resposta a infecções por uma variedade de patógenos (Boehm et al., 1997; Stark, 1998). Porém estudos recentes têm demonstrado que existem outras células secretoras de IFN- γ incluindo macrófagos (Munder et al., 1998), células dendríticas (Fukao et al., 2000), células T CD4+ imaturas e até mesmo linfócitos B (Yoshimoto et al., 1998).

O IFN- γ está envolvido em uma grande variedade de programas celulares, dentre eles estão a regulação de vários aspectos da resposta imune, a estimulação da atividade bactericida de fagócitos, a estimulação da apresentação de antígenos através da regulação da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II, a síntese indutível de óxido nítrico (NO), a regulação de interações entre leucócitos e endotélio, a indução de componentes da cascata do complemento, apresenta efeitos sobre a proliferação celular e apoptose além de estar envolvido na regulação de uma variedade de genes cuja função permanece obscura. A implementação de uma diversidade de processos celulares por esta única citocina se deve a padrões complexos de regulação gênica célula-

específica, já que muitos dos genes regulados por IFN- γ são por sua vez fatores de transcrição de outros genes (Boehm et al., 1997).

Os IFNs exercem seus múltiplos efeitos após se ligarem aos seus respectivos receptores celulares (Vilcek & Sem, 1994) e induzem um conjunto de genes comuns e/ou específicos, denominados genes estimulados por IFNs (ISGs) (Langer & Pestka, 1988). Em 1990, Staheli listou cerca de 20 genes regulados por IFN- γ . Em 1997, em uma nova lista obtida por Boehm e colaboradores já constavam mais de 200 genes. Posteriormente Der et al. (1998) identificaram através de *microarrays* 626 genes cuja expressão do mRNA foi alterada em pelo menos 2 vezes pelo estímulo de fibroblastos da linhagem HT1080 com IFNs.

1.1.2 - Mecanismos antimicrobianos e/ou microbiostáticos ativados por INF γ .

Há vários mecanismos induzidos por IFN- γ que são responsáveis pela morte de patógenos intra e extracelulares. Diversos trabalhos têm mostrado a importância destes mecanismos na defesa do hospedeiro contra patógenos, incluindo *T. cruzi*, *Leishmania spp.*, *T. gondii*, *Chlamydia spp*, *Rickettsia prowazekii*, *Plasmodium falciparum* e *Schistosoma mansoni* (revisado por Stafford et al., 2002).

Os mecanismos de controle do crescimento intracelular parasitário induzidos pelo IFN- γ são variados, podendo ser tanto oxigênio dependentes, como a produção de radicais livres tóxicos (peróxido de hidrogênio - H₂O₂, íon superóxido O₂⁻ e radical hidroxila OH⁻), quanto oxigênio independentes, como a expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), a geração de leucotrienos, a depleção de ferro e de aminoácidos essenciais à sobrevivência do patógeno (Aguet, 1988). Esses mecanismos não se restringem apenas às células de defesa do hospedeiro, macrófagos e monócitos. Fibroblastos humanos e murinos (Wisseman & Waddell, 1983; Pfefferkorn, 1984), células humanas endoteliais, epiteliais e parenquimatosas (Murray et al., 1985; Byrne et al., 1986; Schofield et al., 1987) também são capazes de responder a ativação com IFN- γ . Estas células são deficientes no sistema de oxidação e nelas, os mecanismos dependentes de oxigênio induzidos pelo IFN- γ não são ativados. Assim, nestas células, o principal mecanismo de inibição da replicação de patógenos exercido pelo IFN- γ é a depleção de nutrientes essenciais à sobrevivência do patógeno, entre eles o aminoácido triptofano (TRP) (revisado por Stafford et al., 2002).

1.1.3 - Degradação do triptofano (TRP)

A degradação do TRP como resposta antimicrobiana foi descrita inicialmente por Pfefferkorn (1984), que demonstrou que o parasito *T. gondii* requer TRP para o crescimento intracelular e sobrevivência nos fibroblastos humanos.

O TRP além de ser um aminoácido essencial é o mais raro e o menos disponível para o metabolismo constituindo aproximadamente 1% dos aminoácidos totais em proteínas celulares (Ozaki et al., 1987). Apenas plantas e alguns microrganismos seletos são capazes de sintetizar TRP *de novo*. A Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) é uma proteína indutível encontrada em praticamente todos os tecidos e está envolvida no primeiro passo do catabolismo do TRP que é a conversão em N-formilkinurenina (Taylor et al., 1991) (Figura 1).

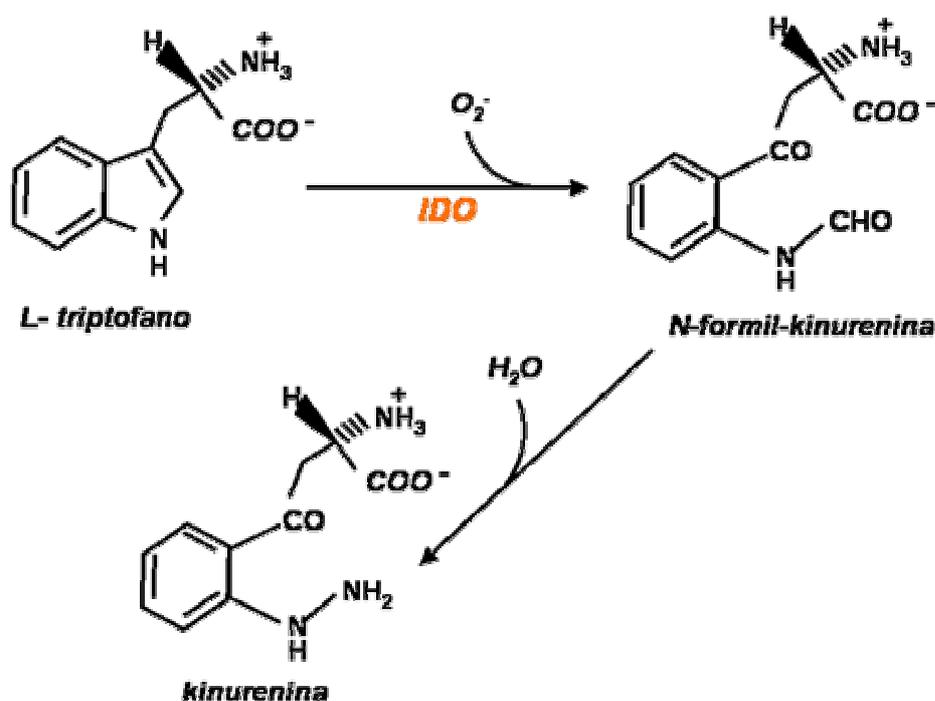


Figura 1 – Esquema do primeiro passo do metabolismo do aminoácido triptofano

A IDO é uma proteína induzida por IFN, sendo o IFN- γ seu indutor mais potente (Ozaki et al., 1991), podendo em alguns casos induzir uma depleção completa dos estoques de TRP intracelulares tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MacKenzie et al, 1999). A IDO participa da imunidade inata do hospedeiro contra patógenos. Vários tipos celulares, incluindo células da

linhagem mielóide (macrófagos derivados de monócitos e células dendríticas), fibroblastos, células endoteliais e algumas linhagens de células tumorais expressam aIDO após exposição ao IFN- γ (Taylor et al, 1991).

Uma vez que muitos microrganismos dependem de TRP exógeno, eles são sensíveis à depleção de TRP causada pela IDO; exemplos incluem *Chlamydia pneumoniae*, *T. gondii* (Pfefferkorn, et al, 1984) e algumas bactérias como estreptococos do grupo B e micobactérias (MacKenzie et al, 1998). Da mesma forma, durante a infecção viral, a IDO foi capaz de inibir a replicação *in vitro* do citomegalovírus (Bodaghi et al, 1999) e do vírus do herpes simples (Adams et al., 2004). A importância da degradação do TRP na regulação do crescimento de parasitos em macrófagos tem sido demonstrada por vários autores (Carlin et al, 1989; Schmitz et al, 1989; Paguirigan et al, 1994; MacKenzie et al, 1998; Daubener et al, 1999 e MacKenzie et al, 1999). Assim, patógenos intracelulares e mesmo aqueles que vivem em íntima associação com a célula hospedeira têm sua replicação inibida pela IDO.

1.1.4 – As vias de transdução de sinal de citocinas

Para que uma citocina possa atuar sobre uma célula e alterar sua expressão gênica é necessário que ela se ligue a um receptor específico na membrana celular. O papel do receptor de membrana é captar o estímulo e transferi-lo ao núcleo celular através de sucessivas interações moleculares. Essa transferência é denominada Via de Transdução de Sinal (Johnson et al., 1994).

Os processos de transdução de sinal ativados por citocinas requerem a fosforilação e a desfosforilação de proteínas intracelulares para a propagação do sinal químico da superfície celular até o núcleo. A sinalização celular é regulada por duas principais classes de enzimas, as proteínas quinases e as proteínas fosfatases que realizam respectivamente processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas. Estas atividades constituem mecanismos de controle crítico para numerosos processos fisiológicos como crescimento celular, motilidade, metabolismo, regulação do ciclo celular e integridade do citoesqueleto (Ptashne & Gann, 2002).

A importância da fosforilação na transdução de sinal se baseia no fato de que a alta densidade de cargas negativas de um grupo fosforil, juntamente com sua forte propensão a formar múltiplas pontes de hidrogênio, pode causar alterações dramáticas na estrutura e nas características funcionais da proteína afetada, ocasionando nesta, mudanças conformacionais que permitem a transmissão do sinal químico (Ptashne & Gann, 2002).

1.1.5 - A via de transdução de sinal do IFN- γ

O receptor de membrana do IFN- γ é formado por um complexo protéico de alta afinidade que consiste de uma glicoproteína transmembrana e uma proteína acessória. Ele é formado por duas cadeias polipeptídicas denominadas IFN- γ R1 e IFN- γ R2. A estas cadeias estão associadas duas proteínas tirosina-quinases da família das quinases Janus (JAK1 e JAK2), assim chamadas por terem dois domínios simétricos assemelhando-se à figura de duas cabeças da mitologia romana, o deus Janus (Johnson et al., 1994). A ligação do IFN- γ ao domínio extracelular de seus receptores faz com que as duas cadeias se unam ativando as JAKs. As JAKs quando ativadas fosforilam uma a outra por um processo chamado fosforilação cruzada, onde JAK2 fosforila a si própria e a JAK1, aumentando assim a atividade de ambas as quinases. JAK1 fosforila um resíduo de tirosina específico no domínio intracelular do receptor IFN- γ R1. Esse passo é fundamental para a sinalização do IFN- γ , pois cria um sítio de ligação para o recrutamento de uma molécula sinalizadora chamada STAT1 α (*signal transducer and activator of transcription*) específica. A STAT1 α ligada é então fosforilada pela JAK2 o que promove sua dimerização e a formação do complexo chamado GAF (*Gamma activated factor*). Este migra para o núcleo onde se liga a seqüências específicas na região promotora dos genes induzidos por IFN, conhecidas como GAS (*Gamma activated site*), para ativar a expressão de genes induzidos por IFN- γ (Figura 2).

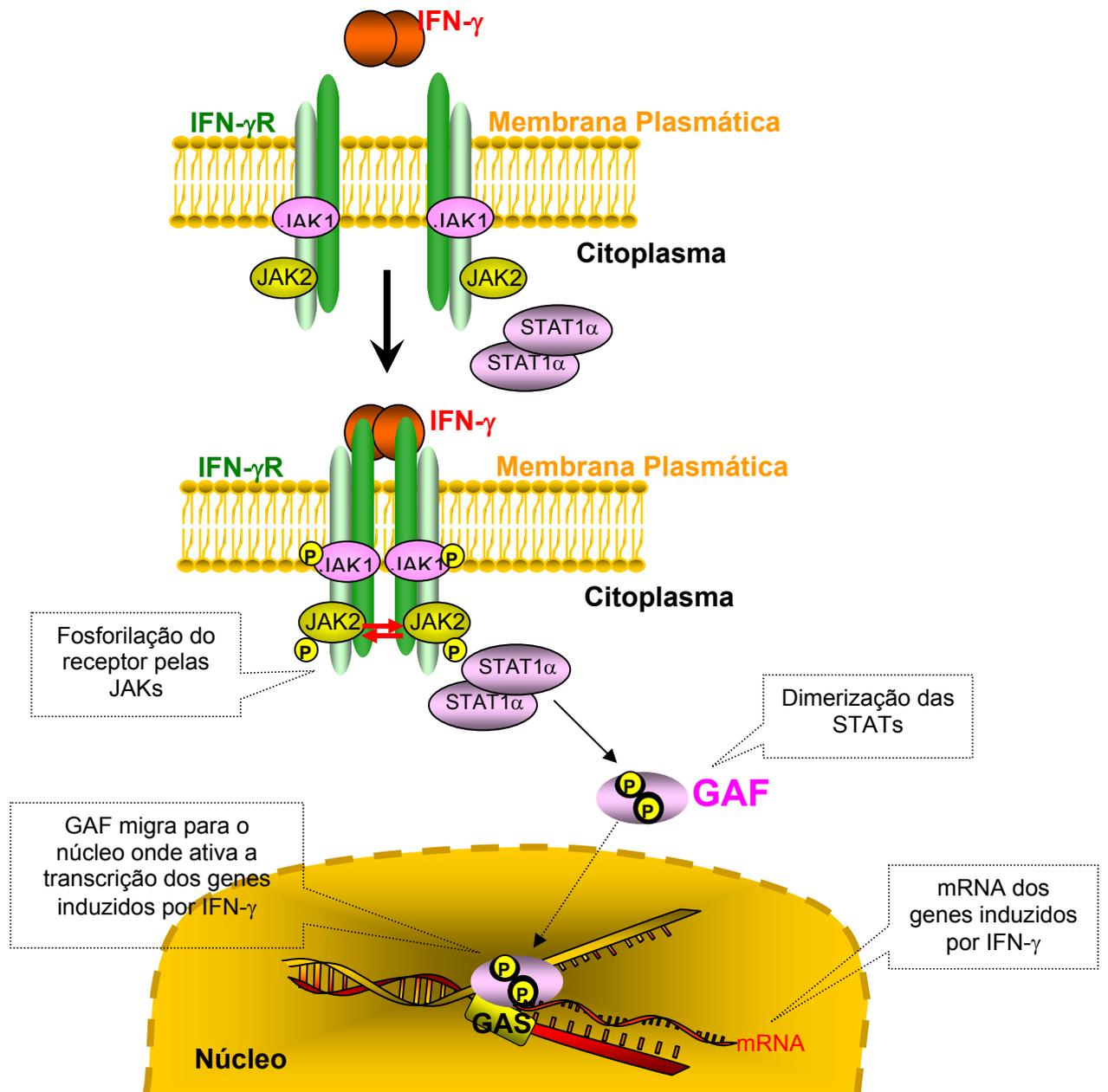


Figura 2 – Esquema da via de transdução de sinal ativada por IFN-γ (via do tipo JAK/STAT).

1.1.5.1 - Os fatores de transcrição ativados por IFN- γ

A elucidação da via de sinalização dos IFNs levou ao descobrimento de uma família de fatores de transcrição denominada fatores reguladores de interferon (IRFs). Os IRFs são uma família de proteínas que se ligam ao DNA podendo atuar como ativadores ou repressores da transcrição gênica ativada por IFN- γ . Estas proteínas exibem alta homologia na região N-terminal (chamada domínio IRF) que se liga a seqüências presentes na região promotora dos ISGs conhecidas como elemento de resposta a IRF (IRF-E) ou elemento de resposta estimulado por IFN (ISRE). Atualmente a família dos IRFs é composta por 9 membros: IRF-1 a IRF-7, IRF-8 (ICSBP) e IRF-9 (IFN-stimulated gene factor 3 γ [ISGF-3 γ]). Entretanto, as funções fisiológicas de todos os membros ainda não foi esclarecida (Taniguchi et al., 2001). O IRF-1 é fortemente induzido por IFN- γ e participa em diversos programas celulares IFN- γ -específicos (Sims et al, 1993). Ele é um gene primário de resposta cuja transcrição é mediada por um sítio GAS e é também induzido por outras citocinas incluindo TNF (Fujita et al, 1989). Ele se liga à seqüência ISRE encontrada nos promotores dos ISGs. Porém, o ISRE não está associado apenas com o IRF-1, mas também com outros membros da família de fatores de transcrição como o IRF-2. O IRF-2 apresenta uma alta homologia de seqüência com IRF-1 e compete pelo mesmo sítio de ligação nos promotores de muitos ISGs. IRF-2 é um fator expresso constitutivamente em vários tipos celulares e tem sua expressão aumentada por IFN- γ , porém, atua como um repressor antagonizando os efeitos de IRF-1 (Paludan, 1998). Chon et al. (1996) mostraram que STAT1 e IRF-1 atuam cooperativamente para mediar a expressão daIDO por IFN- γ , e que camundongos *knockouts* para IFN- γ ou IRF-1 foram incapazes de expressar aIDO. Blanco et al. (2000) mostraram que IRF-1 e IRF-2 estão diretamente envolvidos na regulação da expressão de ciclooxigenases, principais enzimas mediadoras do processo inflamatório induzidas por IRF-1/IFN- γ *in vivo*. Esses resultados sugerem a participação destes fatores na indução daIDO pelo IFN- γ .

2 - Mecanismos de evasão de patógenos intracelulares à resposta mediada por IFN- γ

Na tentativa de assegurar sua sobrevivência dentro das células hospedeiras, os patógenos, ao longo da evolução, desenvolveram estratégias sutis, porém efetivas para

subverter a resposta imune do hospedeiro. Muitos patógenos intracelulares incluindo *Leishmania* (Reiner et al., 1988), HIV (Pinching et al., 1990) e *Yersinia* (Bliska et al., 1991) promovem disfunção das células fagocíticas mononucleares que podem contribuir para o desenvolvimento de infecções crônicas. Vários estudos têm identificado e caracterizado muitas disfunções em macrófagos causadas por patógenos que podem contribuir para a sua sobrevivência dentro da célula. Dentre elas estão o bloqueio do metabolismo oxidativo, a inibição da indução de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-12, a supressão da expressão da iNOS e da produção de óxido nítrico (NO), a regulação de vários genes, como os MHC de classe I e II que auxiliam a célula infectada a apresentar seus antígenos ao sistema imunológico e a redução da resposta aos forbois-ésteres requeridos para a indução da expressão do gene *c-fos* (revisado por Stafford et al., 2002).

Recentemente, Buates e Matlashewski (2001) estudaram o perfil da expressão gênica de macrófagos infectados por *L. donovani* utilizando a metodologia de microarranjo de cDNA, técnica que avalia a expressão diferencial de vários genes. Os autores mostraram que a infecção por *L. donovani* causou a diminuição da expressão de aproximadamente 40% dos genes de macrófagos, dentre eles, muitas proteínas envolvidas em vias de transdução de sinal incluindo MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) 1 e 3, fatores de transcrição (NF- κ B) além de genes envolvidos na resposta do tipo Th1 contra *Leishmania*.

Muitos dos mecanismos utilizados freqüentemente por patógenos para subverter a resposta imune do hospedeiro vertebrado envolvem a modulação da transcrição celular pela alteração ou inibição das vias de transdução de sinal intracelulares. Essas alterações geralmente são alcançadas por meio de interferências na expressão dos fatores de transcrição que regulam estas vias e/ou de alterações no estado de fosforilação das proteínas celulares envolvidas na via.

A interferência nos processos de fosforilação e desfosforilação celular pode ocorrer pela alteração de proteínas quinases ou fosfatases celulares. Isto pode ocorrer durante a infecção por patógenos que expressam suas próprias fosfatases, que agiram sobre fosfoproteínas celulares, ou pela modulação ativa da atividade fosfatase do hospedeiro (Bach et al., 1997). A desfosforilação de proteínas celulares envolvidas na transdução de sinal como mecanismo de evasão de patógenos já foi descrita em microrganismos como *Yersinia* (Bliska et al, 1991), *Leishmania* (Olivier et al, 1998), *Mycobacterium spp* (Knutson, et al., 1998), e o vírus da Hepatite C (Taylor et al., 1999).

3 - O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *T. cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Ele apresenta um ciclo biológico bastante complexo que inclui três formas evolutivas distintas e que requer a participação de um hospedeiro invertebrado, insetos triatomíneos e de um hospedeiro vertebrado, que abrange uma grande variedade de mamíferos incluindo o homem (WHO, 2002).

A doença de Chagas é a doença parasitária de maior relevância no continente Sul Americano e a terceira numa escala global depois da malária e esquistossomose. Ela ocorre nas Américas principalmente na área que vai do norte do México até o sul da Argentina (Figura 3) onde afeta 16 a 18 milhões de pessoas (WHO, 2002).

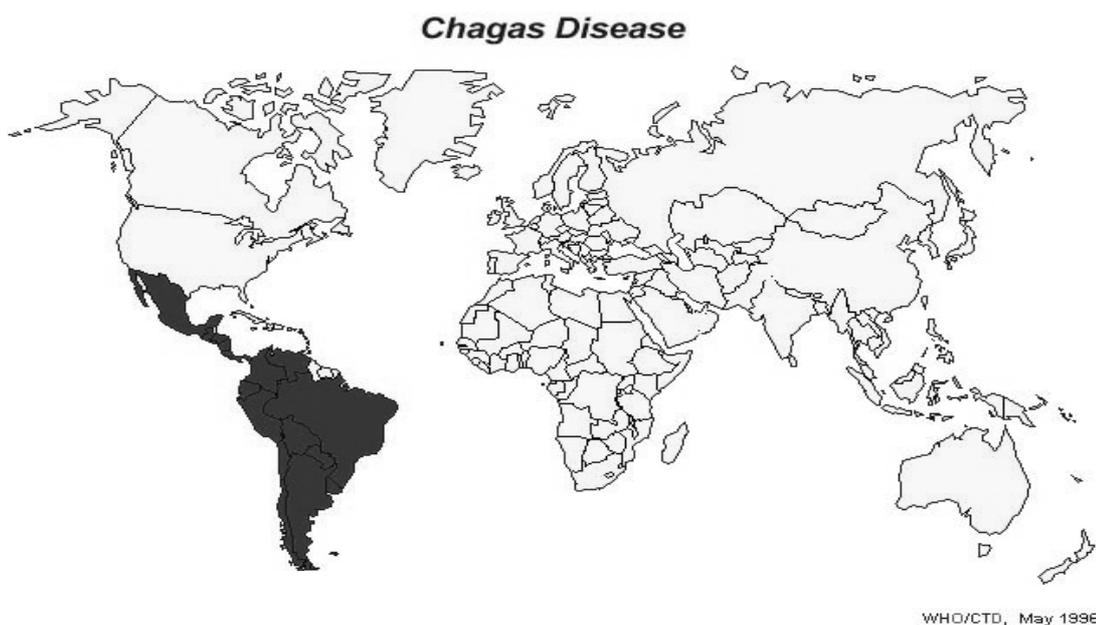


Figura 3 – Distribuição da Doença de Chagas WHO, 2002.

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde mostram a ocorrência de 21.000 mortes e a incidência de 200.000 casos novos ao ano na América Latina (WHO, 2002). No Brasil a doença foi considerada endêmica nos estados do litoral desde o Ceará até o Rio Grande do Sul e nos estados centrais em Goiás e Minas Gerais e ocorre em uma área de três milhões de quilômetros quadrados. São cerca de 2.500 municípios, envolvendo uma

população de mais de 28 milhões de pessoas expostas ao risco de contaminação e uma população de cinco milhões de infectados (Dias et al., 2002).

Mesmo com a eficiência do controle da transmissão vetorial, particularmente através da iniciativa de controle nos países do Cone Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai), o tratamento dos pacientes chagásicos ainda é um problema. A quimioterapia específica da doença de Chagas tem se mostrado problemática já que apenas dois fármacos são disponibilizados para o tratamento de pacientes infectados: o composto derivado do nitrofurano, o Nifurtinox (NFX) (Lampit – Bayer) e o composto derivado do nitroimidazol, o Benzonidazol (BZ) (Rochagan – Roche), sendo que no Brasil apenas este último está comercialmente disponibilizado. Ambas as drogas reduzem a duração e a severidade clínica da infecção aguda pelo *T. cruzi* e levam a cura parasitológica em 60% dos pacientes tratados nos primeiros estágios da doença. Entretanto, elas exibem uma eficácia muito baixa (6 a 10%) no tratamento de pacientes com infecção crônica ou imunodeprimidos (Urbina et al., 1999). Além disso, problemas como diferenças na susceptibilidade de cepas do parasito a drogas já demonstradas por diversos autores (Hauschka, 1949; Bock et al., 1969; Haberkorn & Gonnert, 1972; Brener et al., 1976; Andrade et al., 1985 e Neal & Van Bueren, 1988), a resistência natural de cepas de *T. cruzi* a drogas (Andrade et al. 1985; Filardi & Brener, 1987) e ainda o fato de diversas cepas apresentarem resistência cruzada a ambas as drogas implicam nas baixas percentagens de cura detectadas em pacientes chagásicos crônicos e dificultam ainda mais o tratamento dessa doença (Urbina et al., 1999).

Diferentes autores obtiveram cepas de *T. cruzi* resistentes. Dvorak & Howe (1977) e Nozaki et al. (1996) obtiveram cepas de *T. cruzi* resistentes ao NFX e Nirdé et al. (1995) obtiveram cepas de *T. cruzi* resistentes ao BZ. Entretanto, estudos comparativos não mostraram correlação entre a susceptibilidade de cepas de *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Scott & Matthews, 1987; Neal & Van Bueren, 1988; Ribeiro-Rodrigues et al., 1995). Haberkorn & Gonnert (1972) foram capazes de selecionar uma cepa de *T. cruzi* com resistência *in vivo* a nitrofuranos, porém não foi capaz de selecionar resistência ao NFX. Em um trabalho realizado em nosso laboratório, Murta & Romanha (1998) fizeram a seleção *in vivo* de uma população de *T. cruzi* com resistência ao BZ (BZR) a partir da população selvagem da cepa Y do *T. cruzi* (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953). Ambas as populações apresentaram níveis de parasitemia e mortalidade semelhantes em camundongos, porém ao contrário do que foi observado em camundongos infectados com a população BZR, o tratamento com uma alta dose de BZ (500mg/kg) no pico de parasitemia eliminou todas as formas sangüíneas encontradas nos camundongos infectados com a população BZS.

Além de implicações na quimioterapia, o fenótipo de resistência a drogas de cepas de *T. cruzi* está também relacionado com diferenças na resposta imune do hospedeiro. Muller et al. (1986) observaram que algumas cepas de *T. cruzi* podem estimular mais o sistema imune do que outras. De fato, Michailoswsky et al. (1998) estudaram o papel de citocinas na eficácia do tratamento com BZ e observaram que cepas sensíveis de *T. cruzi* são indutoras mais potentes de IL-12 comparadas com cepas resistentes que se mostraram fracas indutoras desta citocina tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Murta et al. (1998) mostraram que a síntese de IFN- γ e NO foram significativamente aumentadas em esplenócitos murinos infectados com a população BZS de *T. cruzi* comparados com esplenócitos infectados com a população BZR após o tratamento com BZ. Posteriormente, os autores mostraram que a fagocitose e destruição de parasitos por macrófagos foram menores para a população BZR do que para a BZS (Murta et al., 1999b). Estes resultados sugerem que parasitos susceptíveis a drogas são melhores estimuladores da resposta imune do hospedeiro mediada por IFN- γ .

Estudos recentes sugerem que a ativação do sistema imune durante a quimioterapia pode intensificar a eficácia do Benzonidazol (BZ) contra a infecção pelo *T. cruzi*. Michailowsky et al. (1998) mostraram que a associação da quimioterapia com a administração de IL-12 recombinante, uma potente indutora de IFN- γ , intensificou a eficácia do BZ no tratamento de camundongos infectados com o parasito. Estes achados estão em consonância com os resultados de Bahia et al. (2000) que observaram uma maior produção de IFN- γ nos pacientes chagásicos tratados com BZ curados em relação aos não curados. Recentemente, um estudo realizado em nosso laboratório utilizando camundongos *knockouts* para várias citocinas demonstrou que a ativação do sistema imune pelo parasito e IFN- γ endógeno têm um papel essencial na eficácia do BZ no tratamento contra infecções causadas pelo *T. cruzi* (Romanha et al., 2002).

O IFN- γ tem sido muito estudado e é considerado uma citocina protetora, uma vez que macrófagos ativados produzem metabólitos tóxicos para o parasito tendo sido identificado como um fator responsável pela resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi* (Reed, 1988; Torrico et al., 1991; Silva et al., 1992) e como um potente fator ativador de macrófagos (Wirth et al., 1985). Camundongos com deficiência na produção de IFN- γ ou nos genes que codificam os receptores de IFN- γ mostraram muitas falhas nas funções imunológicas que se tornaram evidentes quando esses animais foram desafiados com microrganismos infecciosos. Diversos autores relataram um aumento na susceptibilidade a muitos patógenos intracelulares tais como *Listeria monocytogenes*, *L. major*, *Mycobacteria*, *Plasmodium falciparum* e o vírus da vaccinia (revisado por Stafford et al., 2002). A

administração de IFN- γ recombinante em camundongos aumenta a resistência à infecção pelo *T. cruzi* levando à diminuição da parasitemia e aumento da sobrevivência (Reed, 1988).

Na infecção pelo *T. cruzi* a atividade tripanosomicida de macrófagos murinos ativados pelo IFN- γ é mediada, em parte, pela enzima iNOS, que metaboliza o aminoácido arginina gerando NO (Gazzinelli et al., 1992, Muñoz-Fernandez et al., 1992). Entretanto, o mecanismo de produção de NO em células de origem humana estimuladas pelo IFN- γ é bastante controverso. Estudos prévios especulam que o NO pode não ser um mecanismo antimicrobiano de macrófagos humanos (Nathan & Hibbs, 1991; Denis, 1994), entretanto, diversos trabalhos têm demonstrado a produção de NO e a eliminação de patógenos por mecanismos dependentes de L-arginina em macrófagos humanos (Zeng et al., 2003). Além disso, alguns autores conseguiram clonar o gene da iNOS de hepatócitos e macrófagos humanos. É atualmente aceita a hipótese de que a iNOS faça parte da resposta antimicrobiana em macrófagos (revisado por Stafford et al., 2002). Em infecções pelo *T. cruzi* porém, a participação do NO ainda não foi demonstrada em células de origem humana, deixando em aberto o mecanismo molecular envolvido no controle do *T. cruzi* por células humanas ativadas com esta citocina.

Em um trabalho realizado em nosso laboratório, Cerávolo e colaboradores (1999) estudaram o papel da degradação do TRP pelaIDO no controle da multiplicação intracelular de formas amastigotas de *T. cruzi* e de *T. gondii* em fibroblastos humanos estimulados por rIFN- γ . Os resultados mostraram que ao contrário do *T. gondii*, a replicação de amastigotas de *T. cruzi* nestas células não foi inibida pelo rIFN- γ . Os autores também mostraram, através de estudos de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase nos produtos da transcriptase reversa), que a ativação com rIFN- γ induziu a expressão do mRNA daIDO em fibroblastos humanos. Entretanto, fibroblastos mutantes, com defeito na via de transdução de ativação daIDO pelo IFN- γ , não expressaram mRNA para a enzima. Como esperado, o rIFN- γ não inibiu a replicação do *T. gondii* nem do *T. cruzi* nos fibroblastos mutantes.

Diante desses resultados, nosso grupo passou a investigar os possíveis mecanismos utilizados pelo *T. cruzi* para escapar da resposta mediada pelo IFN- γ nos fibroblastos humanos. Chaves et al. (1998) mostraram que a infecção de fibroblastos humanos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* inibiu parcialmente a via do catabolismo do TRP induzida pelo rIFN- γ e que o parasito foi capaz de bloquear parcialmente a ativação transcricional daIDO induzida pelo rIFN- γ . Além disso, a inibição da expressão daIDO foi diretamente relacionada com o tempo de infecção e o número de parasitas utilizados na infecção das células.

Na tentativa de elucidar em quais pontos da via de transdução de sinal do IFN- γ o *T. cruzi* estaria interferindo para suprimir a expressão daIDO, Chaves et al. (2001) estudaram através de RT-PCR a expressão do mRNA dos fatores reguladores de INF- γ IRF-1 e IRF-2 e do antígeno leucocitário humano HLADR- β , outro gene induzido por IFN- γ , em fibroblastos humanos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e estimulados com IFN- γ . Os autores observaram que a infecção pelo *T. cruzi* produziu uma diminuição da expressão do mRNA do HLADR- β e um aumento da expressão do mRNA do fator IRF-2. O fato do *T. cruzi* inibir a transcrição gênica do HLADR- β sugere que o parasita não esteja bloqueando apenas a via de ativação específica para aIDO, mas esteja interferindo de modo geral na ativação de genes induzidos pelo IFN- γ . Um outro possível mecanismo de escape investigado foi a participação das proteínas tirosina fosfatases. Os resultados mostraram que extratos proteicos obtidos de fibroblastos humanos infectados com o *T. cruzi*, estimulados ou não com o rIFN- γ , apresentaram um aumento significativo da atividade destas enzimas. Isto sugere que o parasito seja capaz de produzir fosfatases, ou induzir as fosfatases celulares, que podem desfosforilar moléculas importantes na via de transdução de sinal do IFN- γ . Dando continuidade a estes estudos, neste trabalho, investigamos se o fenótipo de resistência de cepas do *T. cruzi* a drogas poderia estar relacionado com a modulação da resposta mediada por IFN- γ . Dois possíveis mecanismos foram investigados em fibroblastos humanos infectados com as populações sensíveis e resistentes de *T. cruzi*: 1) a expressão diferencial do mRNA daIDO, dos fatores IRF-1 e 2 e a expressão de fosfatases do parasito que poderiam estar desfosforilando proteínas da via de transdução de sinal do IFN- γ . Dessa forma, neste trabalho investigamos se cepas de *T. cruzi* sensíveis e resistentes a drogas poderiam modular diferentemente a resposta mediada por esta citocina em fibroblastos humanos. Pretendemos assim esclarecer mais alguns aspectos fundamentais do mecanismo de evasão do *T. cruzi* à morte pelas células hospedeiras humanas e contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos na doença de Chagas.

Justificativa

O *T. cruzi* é um parasito que infecta preferencialmente macrófagos, fibroblastos, células de Schwann e miócitos (Veronesi & Focaccia, 2004). A resistência à infecção pelo *T. cruzi* durante a fase aguda é criticamente dependente da ação do IFN- γ que é produzido após a infecção, ativa os mecanismos de defesa celulares e controla a infecção pelo parasito. Nos macrófagos, os mecanismos de controle da replicação de patógenos intracelulares induzidos pelo IFN- γ são variados, podendo ser oxigênio dependentes ou independentes (Aguet, 1988). Os outros tipos celulares, não envolvidos diretamente com a imunidade, são deficientes no sistema oxidativo excluindo-se assim os mecanismos dependentes de oxigênio induzidos por esta citocina. Nestas células os mecanismos de controle induzidos pelo IFN- γ se restringem à indução da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), enzima que degrada o aminoácido essencial triptofano (TRP). A indução desta enzima leva à depleção do estoque de TRP intracelular e conseqüentemente à inibição da multiplicação dos parasitos por falta desse aminoácido. Entretanto, em nosso laboratório, Cerávolo et al., (1999) mostraram que a replicação de amastigotas do *T. cruzi* em fibroblastos humanos não foi inibida pela degradação do TRP induzida pelo rIFN- γ .

Dando continuidade aos estudos de Cerávolo, Chaves et al. (2001) mostraram que a infecção de fibroblastos humanos com a cepa Y de *T. cruzi* e a posterior estimulação com IFN- γ produziu uma diminuição da expressão do mRNA do HLADR- β e um aumento da expressão do mRNA do fator IRF-2. Uma vez que o IRF-2 é um fator que inibe a transcrição gênica ativada pelo IFN- γ , o aumento da sua expressão, induzido pelo *T. cruzi*, pode estar envolvido na inibição da expressão dos genes da IDO e do HLADR- β em fibroblastos humanos. Esta resistência do *T. cruzi* às ações induzidas pelo IFN- γ podem, portanto, contribuir para a persistência do parasita no hospedeiro durante a fase crônica da doença. A participação das proteínas tirosina-fosfatases como um outro possível mecanismo de escape também foi investigada em nosso laboratório. Os resultados mostraram que extratos proteicos obtidos de fibroblastos humanos infectados com o *T. cruzi*, estimulados ou não com o rIFN- γ , apresentaram um aumento significativo da atividade destas enzimas (dados não publicados), sugerindo que o parasito produz, ou induz fosfatases da própria célula, que podem defosforilar moléculas importantes na via de transdução de sinal do IFN- γ . Dando prosseguimento a esses estudos, neste trabalho investigamos se o fenótipo de resistência de cepas do *T. cruzi* a drogas poderia estar relacionado com a modulação da resposta mediada por IFN- γ . Dois possíveis mecanismos foram investigados em fibroblastos humanos infectados com as populações de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao BZ: 1) a expressão diferencial do mRNA da IDO, dos fatores IRF-1 e 2 e a expressão de fosfatases do parasito que poderiam

estar desfosforilando proteínas da via de transdução de sinal do IFN- γ . Este trabalho é parte de um projeto maior que vem sendo desenvolvido em nosso laboratório, que tenta responder aspectos fundamentais do mecanismo de evasão do *T. cruzi* ao ataque do sistema de defesa das células hospedeiras humanas e contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos na doença de Chagas, bem como do fenótipo de resistência a drogas em cepas de *T. cruzi*.

Objetivos

OBJETIVO GERAL

Investigar se o fenótipo de resistência do *Trypanosoma cruzi* a drogas está relacionado com o mecanismo de escape à ação antimicrobiana do IFN- γ em fibroblastos humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a estabilidade do fenótipo de resistência da população de *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol (BZR) após passagens seriadas em cultura de tecidos.
- Avaliar e quantificar através de qPCR o efeito da infecção pelas populações de *T. cruzi* sensíveis (BZS) e resistentes (BZR) ao benzonidazol sobre a expressão do mRNA da Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e dos fatores de regulação do IFN- γ (IRF-1 e IRF-2) em fibroblastos humanos estimulados com rIFN- γ .
- Busca de seqüências nucleotídicas de proteínas tirosina-fosfatases de *T. cruzi* e de fibroblastos humanos em bancos de dados.
- Avaliar e quantificar através de RT-PCR e qPCR o efeito da infecção pelas populações de *T. cruzi* BZS e BZR sobre a expressão do mRNA da proteína tirosina-fosfatase de *T. cruzi* (TcPTP) nos fibroblastos humanos estimulados com rIFN- γ .

Material e Métodos

1- Linhagem celular

Neste estudo foram utilizados fibroblastos humanos 2C4, gentilmente cedidos pelo Prof. Cláudio Bonjardim do Departamento de Microbiologia da UFMG. A 2C4 é uma linhagem contínua, parental, derivada de fibrosarcoma humano HT 1080 (Bonjardim, 1998).

2- Cultivo celular

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² contendo meio de cultura completo Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM - Sigma), suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF - Gibco) inativado a 56°C durante 30 minutos, 5 µM de L-glutamina, 40 mg/ml de Gentamicina, 20mM do tampão N-[2-hidroxietil] piperazina- N'-[ácido etanosulfônico] (HEPES) pH 7,3 e 5% de bicarbonato de sódio. As culturas foram mantidas em 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade.

As garrafas semeadas com as células 2C4 foram repicadas semanalmente. Após a formação da monocamada, as células foram lavadas com PBS pH 7.2 para a retirada do SBF e descoladas com tripsina (Sigma) a 0,034% diluída 1:4 com EDTA (Sigma) a 0,1% pH 8,0. Em seguida, as garrafas foram incubadas a 37°C por 2min, para que houvesse o completo descolamento das células. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 3 ml de DMEM 10% SBF e centrifugadas a 150 x g, à temperatura ambiente por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em 2 ml de DMEM, contadas em câmara de Neubauer e 2 x 10⁵ células foram semeadas nas garrafas para manutenção. A viabilidade das células após o tratamento com tripsina foi avaliado pela exclusão do azul de trypan.

3 – Citocinas:

O interferon- γ recombinante humano (rIFN γ [R&D Systems]) foi utilizado como estimulador da resposta celular na concentração de 50U/ml. A atividade do rIFN- γ foi estabelecida após experimentos de titulação.

4 – Parasitos:

Neste estudo utilizamos uma população de *T. cruzi* com resistência selecionada *in vivo* ao benzonidazol (BZR) e seu par sensível (BZS) (Murta & Romanha, 1998) obtidos a partir da cepa Y do *T. cruzi* (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953). O protocolo de seleção foi

baseado em passagens sucessivas dos parasitos em camundongos submetidos ao tratamento com alta concentração do BZ (500mg/kg/camundongo). Após 25 passagens os parasitos selecionados apresentaram total resistência ao tratamento com BZ. O fenótipo de resistência se manteve estável por 6 meses na ausência da droga.

4.1 – Manutenção dos parasitos em cultura de fibroblastos.

Para a manutenção do ciclo do *T. cruzi*, as garrafas de cultura foram semeadas com $1,5 \times 10^5$ fibroblastos 2C4 humanos e incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, para que houvesse a adesão das células. Após 24h de incubação, as células foram infectadas com formas tripomastigotas sanguíneas isoladas de camundongos experimentalmente infectados segundo o protocolo de Murta & Romanha (1998). A interação parasita-célula ocorreu por um período de 24h. Após este período os parasitos remanescentes foram retirados e as garrafas de cultura infectadas foram transferidas para estufa a 33°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Normalmente, a liberação dos parasitos para o sobrenadante ocorre no período de 4 a 7 dias após a infecção. Esses parasitos foram utilizados para infecção de novas garrafas e para os ensaios descritos nos itens 6 e 7.

5 – Fármaco utilizado

Benzonidazol: N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida comercializado com o nome Rochagan (Roche). Esse fármaco foi diluído em DMSO (Sigma) na concentração estoque de 160 mg/ml e armazenado a 4°C protegido da luz.

6 – Susceptibilidade *in vitro* (IC₅₀) das populações do *T. cruzi* ao Benzonidazol

O fenótipo de resistência *in vitro* ao BZ foi determinado a partir do cálculo da concentração de BZ necessária para inibir o desenvolvimento de 50% dos parasitos (IC₅₀) em ensaios com a metodologia descrita a seguir:

Em uma placa de 24 poços, foram semeados 10^4 fibroblastos em um volume final de 0,5 ml de DMEM 5% SBF/poço. Após 24 horas, estas células foram infectadas com as populações de *T. cruzi* BZS ou BZR na proporção de 10 parasitos/célula considerando uma taxa de multiplicação celular diária igual a 2. Três horas após a infecção, os parasitos remanescentes foram retirados e as células adicionadas de 0,5 ml de meio fresco. Após 72 horas de infecção, diferentes concentrações do BZ foram adicionadas aos poços da placa. A droga foi diluída em DMSO na concentração de 0,5% que não é tóxica para o parasito nem para a célula. Em cada poço da placa, foi adicionado um volume de 1 ml de DMEM

contendo BZ diluído em DMSO nas concentrações finais de 62,5, 125, 250, 500 e 1000ng/ml. Após os períodos de 24 e 48 horas da incubação com o BZ, os tripomastigotas liberados no sobrenadante da cultura foram contados em câmara de Neubauer. O IC₅₀ do BZ para cada população de *T. cruzi* foi determinado pela contagem do número de parasitos liberados no sobrenadante da cultura na presença da droga, comparado com o controle apenas com 0,5% de DMSO e foi calculado a partir da média de três experimentos realizados em duplicatas.

7- Busca de seqüências

Para a busca por seqüências de proteínas tirosina-fosfatase de *T. cruzi* e de fibroblastos humanos foi utilizado o banco de dados GenBank (NCBI).

8- Expressão do mRNA de genes induzidos por IFN- γ

A expressão do mRNA de genes possivelmente envolvidos no mecanismo de escape do *T. cruzi* foi avaliada quali e quantitativamente através de RT-PCR e qPCR respectivamente. Como controles foram utilizados os genes da gliceraldeído-fosfato desidrogenase humano (GAPDH) e da hipoxantina guanina fosforibosil transferase de *T. cruzi* (TcHGPR) para normalizar a quantidade de cDNA utilizada em cada ensaio, uma vez que estes genes são constitutivamente expressos e não sofrem alterações na sua expressão após estímulo com citocinas.

Para a preparação das amostras a serem analisadas, 5×10^5 fibroblastos 2C4 foram semeados em placas de 6 poços (Nunc). Após 24 horas de incubação, as células foram infectadas com as populações de *T. cruzi* BZS ou BZR em uma proporção de 10 parasitos/célula. A infecção ocorreu por 18 horas e após este período, os parasitos remanescentes foram retirados e as células estimuladas com 50U/ml de rIFN γ por 24 horas. Os tempos de infecção e estimulação foram determinados a partir de experimentos prévios realizados em nosso laboratório envolvendo uma cinética com tempos diferentes de infecção e estimulação. Após este período as células foram lisadas com 1 ml de TRIzol (Invitrogen) para a extração do RNA.

8.1 – Extração do RNA total e síntese do cDNA

O RNA total dos fibroblastos estimulados ou não com rIFN γ infectados ou não com as populações BZS e BZR de *T. cruzi* foi extraído com TRIzol (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células semeadas em placas de 6 poços foram lisadas com 1ml de TRIzol/poço, homogeneizadas e transferidas para tubos de 1,5ml. Em

seguida, foram adicionados 200 μ l de clorofórmio. Este conteúdo foi agitado no vórtex, incubado no gelo por 15min e em seguida centrifugado a 10.000 x g por 15min a 4°C para que ocorresse a separação das fases aquosa e não-aquosa. O RNA presente no sobrenadante (fase aquosa) foi coletado, transferido para outro tubo onde foi acrescido de isopropanol (v/v) e em seguida incubado por 12 horas a -70°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 15min a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento contendo o RNA foi lavado com etanol 95% gelado, misturado no vórtex e novamente centrifugado a 10.000 x g por 15min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol evaporado a 37°C por 10 minutos. O RNA foi ressuspensionado em 50 μ l de água bidestilada tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato-DEPC (SIGMA) e 1mM de EDTA (Sigma). A dosagem e a pureza dos RNAs foram determinadas no espectrofotômetro, a uma absorbância de 260nm e, posteriormente, os mesmos foram armazenados a -70°C até o uso. A integridade dos RNAs foi avaliada em gel de agarose.

O RNA total extraído foi submetido à síntese de cDNA utilizando o kit SUPERSRIPT™ II RNase H⁻ Reverse transcriptase (Invitrogen) segundo as especificações do fabricante. Em tubos de 500 μ l, foram adicionados 1 μ g do RNA e água com DEPC para um volume final de 12 μ l. Em seguida essa mistura foi centrifugada em baixa rotação por 10 segundos aquecida a 70°C por 5min e imediatamente incubada no gelo por 5min. Posteriormente, foram adicionados a essa mistura 0,5 μ g do iniciador oligo dT (500 μ g/ml), 10mM de dNTP, 0,1M de DTT, 1U/ μ l do inibidor de ribonuclease RNAsin (Promega), tampão (50mM Tris-HCl, pH 8.5, 40mM KCl e 6mM MgCl₂) para completar o volume final da reação para 20 μ l. As amostras foram incubadas a 42°C por 2 min, adicionada de 200U da enzima transcriptase reversa SUPERSRIPT™ II RNase H⁻ Reverse transcriptase (Invitrogen) e incubadas a 42°C por 50 min. Após este período, as amostras foram aquecidas a 70°C por 15min para inativar a transcriptase reversa e posteriormente estocadas a -20°C até que fossem testadas em RT-PCR e qPCR (itens 8.2 e 8.3.2).

8.2 – RT-PCR

A técnica de reação em cadeia da polimerase nos produtos da transcrição reversa (RT-PCR) foi utilizada para amplificar os cDNAs com iniciadores específicos para os genes de interesse (Tabela 1). Em um volume de reação de 10 μ l/tubo, foram utilizados 200 μ M de dNTP, 0,5U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1,5mM de MgCl₂, 500mM de KCl, 100mM de Tris-HCl pH 8,0, concentrações adequadas de iniciadores, 1,0 μ l de cDNA e água para completar o volume final. As condições de amplificação da RT-PCR foram: desnaturação inicial a 95°C/5min, anelamento na temperatura de 60°C/30 seg para todos os

iniciadores, extensão a 72°C/30seg, desnaturação a 95°C/30 seg, seguida de 29 ciclos e uma extensão final a 72°C/5min. AS seqüências dos iniciadores estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na reações de RT-PCR e qPCR

Nome	Seqüência (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)
Gliceraldeído-fosfato desidrogenase humana (GAPDH)	F: GTG GTG AAG CAG GCG TCG R: GAC TGA GTG TGG CAG GGA	311
Indoleamina-2,3-dioxigenase humana (IDO)	F: AGCGCCTTGCACGTCTAGTT R: ACC AAA ATA GGA GGC AGT TCC A	148
Fator regulador de Interferon 1 humano (IRF-1)	F: CAC AGA TCT GAA GAA CAT GG R: CTA CTC CAA GAC TCT GGT CA	130
Fator regulador de Interferon 2 humano (IRF-2)	F: TAA GCA CAT CAA GCA AGA ACC AG R: TGG GAC TGT CCT ACA ACT ATG ATG TT	89
Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase do <i>T. cruzi</i> (TcHgPRT)	F: CTA CAA GGG AAA GGG TCT GC R: ACC GTA GCC AAT CAC AAA GG	412
Proteína Tirosina-fosfatase do <i>T. cruzi</i> (TcPTP)	F: CGC GTA TGC GAA CAC AAT TG R: CTG CTG CAG AAA GTG CCT CA	116

A expressão dos diferentes genes foi detectada por visualização dos produtos amplificados em gel de poliacrilamida 6%, corado pela prata. As amostras amplificadas foram ressuspendidas em volume igual de tampão de amostra 2X (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 30 % de glicerol) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em TBE em sistema minigel (Biorad). Em seguida os géis foram fixados em 10% etanol e 0,5% ácido acético durante 10min sob agitação branda, corados com 0,2% de nitrato de prata durante 10min, lavados por 2min em água Milli-Q e revelados com 0,75M de NaOH e 0,1M de formaldeído por 10min sob agitação (Santos *et al.*, 1993). Como padrão de peso molecular foi utilizado o DNA do bacteriófago ϕ X174 digerido com a enzima de restrição Hae III.

8.3 – Análise quantitativa dos genes

8.3.1 – Clonagem dos genes de interesse

Os genes de interesse (Tabela 1) foram clonados em bactérias *Escherichia coli* cepa TOP10F' (Invitrogen). Inicialmente foi realizada uma busca da seqüência completa dos genes no banco de dados *GenBank* e desenhados iniciadores para as regiões codificantes de cada gene. A região codificante dos genes de interesse foi amplificada por PCR e os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. O produto de PCR purificado (4 μ l) foi então submetido à reação de ligação com o vetor de expressão pCR2.1 TOPO (Invitrogen) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para a ligação utilizamos 4 μ l do produto de PCR de cada gene, 1 μ l de solução de sal e 1 μ l do vetor TOPO.

Para a transformação, o vetor contendo o inserto foi inserido em bactérias da linhagem TOP 10F' utilizando a metodologia de Choque térmico. Para isso o volume da reação de ligação foi misturado com 100 μ l de célula cálcio competente (Invitrogen). Posteriormente, o choque foi realizado a 42°C por 30 segundos e seguido de incubação no gelo. Em seguida foi adicionado 1ml de meio Luria-Bertani (LB) sem antibiótico e os tubos foram incubados a 37°C por 1h com agitação a 299 rpm (Shaker – Forma Scientific). Após este período, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 1 min e o sedimento ressuspendido em 200 μ l de meio LB. Metade desse volume foi espalhado em placas contendo meio LB ágar com 100 μ g/ml de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C durante 12h.

Para confirmação da clonagem, as colônias de bactérias foram submetidas a PCR com os iniciadores específicos para os genes alvos. Após a confirmação, as bactérias foram crescidas em 5ml de meio LB com 100 μ g/ml de ampicilina sob agitação durante 14h para extração do plasmídeo. Após o período de crescimento, uma alíquota de 500 μ l da cultura de bactérias foi criopreservada em glicerol 50% e o restante foi utilizado para purificação do plasmídeo com o Kit mini-prep (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente foi feita a dosagem dos plasmídeos no espectrofotômetro, a uma absorbância de 260nm e a sua concentração determinada em ng/ μ l.

8.3.2 – RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

O RT-PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizado para quantificar o nível de mRNA dos genes selecionados. O cDNA, obtido após reação da transcriptase reversa, foi submetido a amplificação por PCR quantitativo (ABI Prism 7000 - Applied Biosystems) com iniciadores específicos para cada gene de interesse (Tabela 1). As reações foram

preparadas utilizando o Kit *SYBR Green* conforme instruções do fabricante (Applied Biosystems). O corante SYBR Green intercala na fita dupla de DNA permitindo quantificar o produto de PCR a cada ciclo da reação. As reações foram preparadas contendo 10 pmoles de cada iniciador, tampão 1X SYBR GREEN (Applied Biosystems), 25 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 1 U AmpliTaq Gold DNA polymerase, 5 μl de cDNA diluído 10X e água deionizada para completar o volume final da reação para 25 μl. As amostras foram submetidas aos ciclos de amplificação: 95°C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg e anelamento/extensão a 60°C por 1 min. Curvas padrão foram utilizadas para cada experimento utilizando diluições seriadas ao décimo do plasmídeo TOPO PCR 2.1 contendo os genes de interesse clonados. O gene da célula, GAPDH, e do parasito, TcHGPRT, foram utilizados para normalizar a quantidade de cDNA das amostras. Os resultados foram analisados utilizando o programa “*Sequence Detection System*” (Applied Biosystems), que permite avaliar a curva de dissociação, a intensidade de fluorescência da amostra a cada ciclo da reação e quantificar o número de cópias conforme curva padrão. O desenho dos iniciadores utilizados para o qPCR foi realizado utilizando o programa “*Primer Express*” (Applied Biosystems). Posteriormente, foi realizada uma pesquisa de homologia em banco de dados utilizando o programa BLASTn (NCBI) para melhor validação das seqüências escolhidas.

9 – Análises estatísticas

Foram calculados a média e o desvio-padrão da média de duplicatas de experimentos de expressão dos genes de interesse nas células não infectadas e não estimuladas, célula infectadas e não estimuladas e células infectadas e estimuladas com rIFN-γ. Para comparar os diferentes níveis de expressão foi utilizado o teste paramétrico de Student-Newman-Keuls considerando a natureza simétrica de distribuição dos valores. As análises foram realizadas no programa estatístico INSTAT (GraphPad, San Diego, CA, USA). O teste de *Student-Newman-Keuls* foi realizado com 95% de confiança, sendo considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados

1 - Estabilidade do fenótipo de resistência ao Benzonidazol.

Realizamos o ensaio de susceptibilidade ao benzonidazol (IC_{50} - concentração inibitória de 50% do desenvolvimento) utilizando fibroblastos humanos infectados com populações BZS e BZR do *T. cruzi* mantidos por até oito passagens em cultura na ausência do BZ. Após 72 horas de infecção as células foram incubadas com meio DMEM com diferentes concentrações de BZ (62.5, 125, 250, 500 e 1000ng/ml) diluído em DMSO. Após os períodos de 24 e 48 horas de incubação com BZ, os tripomastigotas liberados no sobrenadante da cultura foram contados em câmara de Neubauer.

A Tabela 2 mostra a porcentagem de inibição do desenvolvimento dos parasitos BZS e BZR após 48 horas da incubação com diferentes concentrações de BZ. Os resultados mostram que as porcentagens de inibição do desenvolvimento da população BZS foram maiores do que a população BZR para as mesmas concentrações de BZ testadas. Portanto, a população BZR foi mais resistente ao BZ comparado com a BZS. O IC_{50} para a população BZR foi de aproximadamente 500ng/ml e para a população BZS foi de 250ng/ml. Os resultados mostram que após oito passagens em cultura de fibroblastos a população BZR foi duas vezes mais resistente ao BZ comparado com o seu par sensível BZS.

Tabela 2 – Determinação do IC₅₀ das populações BZS e BZR de *T. cruzi* após oito passagens sucessivas em cultura de fibroblastos humanos 2C4 na presença de diferentes concentrações de BZ.

Experimento		Nº de parasitos no sobrenadante x 10⁴/ml (± DPM)	Inibição do desenvolvimento (%)
Controle sem droga		13,70 ± 1,30	0
Controle com DMSO		13,00 ± 1,00	5
BZ (ng/ml)			
BZR	62,5	13,75 ± 0,75	0
	125	12,30 ± 0,70	10
	250	11,00 ± 0,70	19,5
	500	5,70 ± 0,60	52,0
	1000	0	100
Controle sem droga		18,00 ± 1,00	0
Controle com DMSO		17,00 ± 2,00	2,8
BZ (ng/ml)			
BZS	62,5	14,90 ± 1,075	14,8
	125	11,37 ± 1,375	35
	250	8,17 ± 1,175	53,3
	500	1,25 ± 1,250	92,8
	1000	0	100

DPM = Desvio padrão da média

2- Análise da expressão do mRNA de genes induzidos por IFN- γ .

2.1 – Avaliação da qualidade do cDNA e especificidade dos iniciadores por RT-PCR.

A qualidade do cDNA dos genes de interesse e a especificidade dos iniciadores a serem utilizados na qPCR foi avaliada através da técnica de RT-PCR.

A Figura 4 mostra o perfil de amplificação do cDNA daIDO, do IRF-1, do IRF-2 e da GAPDH em fibroblastos humanos estimulados ou não com rIFN- γ . Observamos que houve amplificação dos cDNAs de todos os genes testados evidenciando uma única banda confirmando a especificidade dos iniciadores. Observamos que a expressão do mRNA daIDO só ocorreu nas células estimuladas com rIFN- γ , enquanto que a expressão dos mRNAs do IRF-1 e IRF-2 é constitutiva nos fibroblastos 2C4 e é aumentada após a estimulação com rIFN- γ . O gene da GAPDH foi igualmente expresso nas amostras testadas independentemente da estimulação com rIFN- γ e foi por isso utilizado para normalizar a quantidade de cDNA aplicada em cada amostra nos ensaios de qPCR.

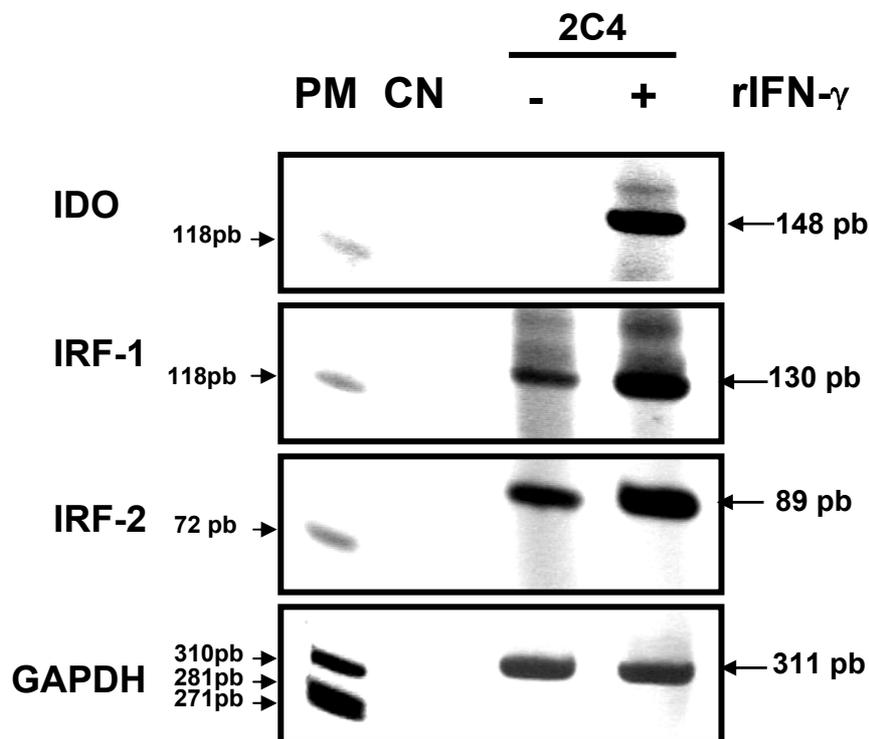


Figura 4 – RT-PCR dos genes da IDO (148pb), IRF-1 (130pb), IRF-2 (89pb) e da GAPDH (311pb) em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata.

2.2 – Avaliação da expressão do mRNA daIDO.

Com o objetivo de investigar o envolvimento da IDO no mecanismo utilizado pelo parasito para escapar da ação antimicrobiana do IFN- γ , avaliamos a expressão do mRNA desta enzima nos fibroblastos humanos 2C4 estimulados pelo IFN- γ e infectados com as populações BZS ou BZR de *T. cruzi*. Os níveis de mRNA do gene da IDO nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR e estimulados com rIFN- γ foram analisados de forma quantitativa através de qPCR. Inicialmente foi obtida uma curva padrão utilizando diluições ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos de cDNA da IDO (10^5 a 10^8 cópias - Figura 5A1) e da GAPDH (10^4 a 10^7 cópias - Figura 5A2) clonados no vetor TOPO pCR2.1. Para ambos os genes, a intensidade de fluorescência de cada amostra, que é proporcional à quantidade de DNA, foi expressa pelo valor do ciclo da PCR tomando como base de análise o *cycle threshold* (C_T). Observamos que ambas as curvas apresentaram uma linearidade satisfatória, com os valores de r^2 próximos de 1 ($r^2 = 0,9977$ para a IDO e 0,9886 para a GAPDH) para uma ampla faixa de concentração dos plasmídeos testada.

A Figura 5 mostra a curva de dissociação dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes da IDO (B1) e da GAPDH (B2), evidenciando um único pico, indicando que somente um produto específico foi amplificado para cada gene. A quantidade de moléculas de cDNA da IDO para as diferentes amostras foi determinada a partir de uma regressão linear dos valores de C_T da curva padrão gerada com as quantidades conhecidas dos plasmídeos da IDO. A quantidade de cDNA das diferentes amostras foi normalizada a partir da análise da expressão do gene constitutivo humano GAPDH.

A Figura 5C mostra a quantidade de moléculas do mRNA da IDO expressa nos fibroblastos humanos infectados com as populações BZS ou BZR e estimulados com rIFN- γ . Os resultados mostram que a estimulação das células 2C4 com rIFN- γ provocou um aumento significativo ($P < 0,01$) de $11,4 \pm 3,0$ vezes na expressão do mRNA da IDO. Por outro lado, a expressão do mRNA da IDO foi significativamente ($P < 0,01$) reduzida nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR. As populações BZS e BZR reduziram $3,7 \pm 0,8$ e $3,3 \pm 0,7$ vezes a expressão do mRNA da IDO respectivamente comparado com o controle (2C4 + rIFN- γ).

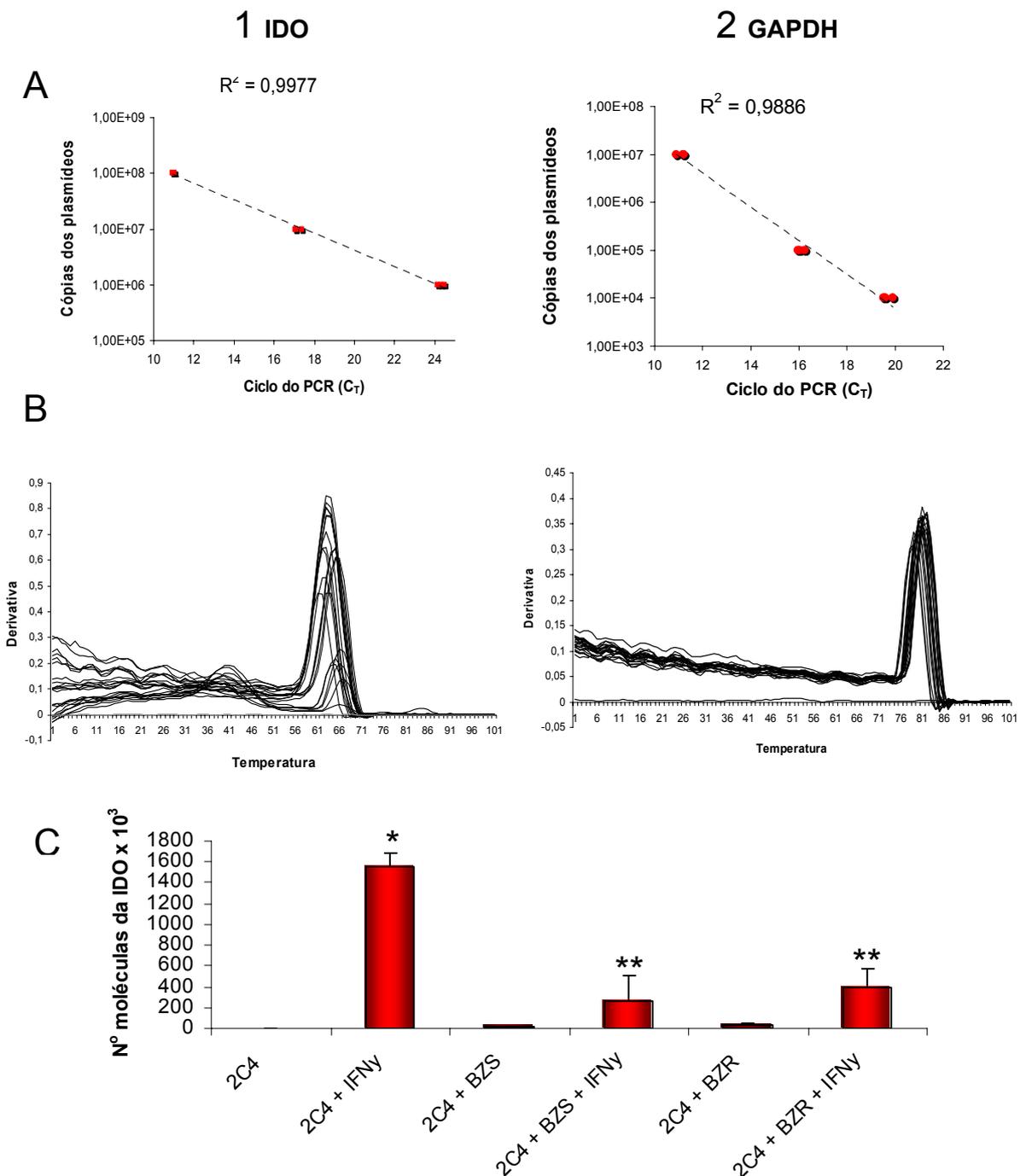


Figura 5 – Amplificação dos genes IDO e GAPDH por qPCR. **A** – Curva padrão obtida a partir da amplificação de diluições seriadas ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de cDNA da IDO (**A1**) e da GAPDH (**A2**). Os gráficos mostram os valores de C_T obtidos para cada uma das diluições. **B** – Gráficos de dissociação mostram a especificidade da amplificação dos genes da IDO (**B1**) e da GAPDH (**B2**). **C** – Número relativo de moléculas do transcrito que codifica o gene da IDO após normalização com a GAPDH em fibroblastos humanos 2C4 infectados com as populações BZS ou BZR de *T. cruzi* e estimulados com 50U/ml de rIFN- γ . *: $p < 0,01$ comparado com 2C4; **: $p < 0,01$ comparado com 2C4 + IFN- γ . Os resultados expressam a média e o desvio-padrão da média de duplicatas de dois experimentos independentes.

2.3 – Avaliação da expressão do mRNA dos fatores reguladores de INF- γ (IRFs)

Com o objetivo de investigar o envolvimento dos fatores reguladores de interferon, IRF-1 e IRF-2, no mecanismo utilizado pelo parasito para escapar da ação antimicrobiana do IFN- γ , avaliamos a expressão destes fatores nos fibroblastos humanos 2C4 estimulados pelo IFN- γ e infectados com as populações BZS ou BZR de *T. cruzi*.

2.3.1 – Avaliação da expressão do mRNA do IRF-1

Os níveis de mRNA do gene do IRF-1 foram avaliados quantitativamente nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR e estimulados com rIFN- γ através de qPCR seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente para o gene da IDO.

Foi obtida uma curva padrão utilizando diluições ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos de cDNA do IRF-1 (10^5 a 10^8 cópias - Figura 6A1) e da GAPDH (10^4 a 10^7 cópias - Figura 6A2). Ambas as retas apresentam uma linearidade satisfatória, com os valores de r^2 próximos de 1 ($r^2 = 0,9906$ para o IRF-1 e $0,9886$ para a GAPDH) para uma ampla faixa de concentração dos plasmídeos testada.

A Figura 6B mostra a curva de dissociação dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes do IRF-1 (B1) e da GAPDH (B2), evidenciando um único pico, demonstrando que somente um produto específico foi amplificado para cada gene.

Os resultados mostram que a expressão do mRNA do IRF-1 é constitutiva nos fibroblastos 2C4 e é significativamente aumentada ($P < 0,001$) em resposta ao estímulo com rIFN- γ . A estimulação com essa citocina aumentou em média $11,2 \pm 6,93$ vezes a expressão do mRNA do IRF-1 nas células não infectadas (2C4 + rIFN- γ). Quando comparamos o controle (2C4 + rIFN- γ) com as células infectadas com a população BZS do *T. cruzi* e estimuladas com rIFN- γ (2C4 + BZS + rIFN- γ) não observamos alterações significativas na expressão do mRNA do IRF-1. Em contraposição, uma redução significativa ($P < 0,05$) de $5,5 \pm 3,4$ vezes na expressão do mRNA do IRF-1 foi observada nos fibroblastos estimulados com rIFN- γ e infectados com a população BZR (2C4 + BZR + rIFN- γ) comparados com o controle (2C4 + rIFN- γ) (Figura 6C).

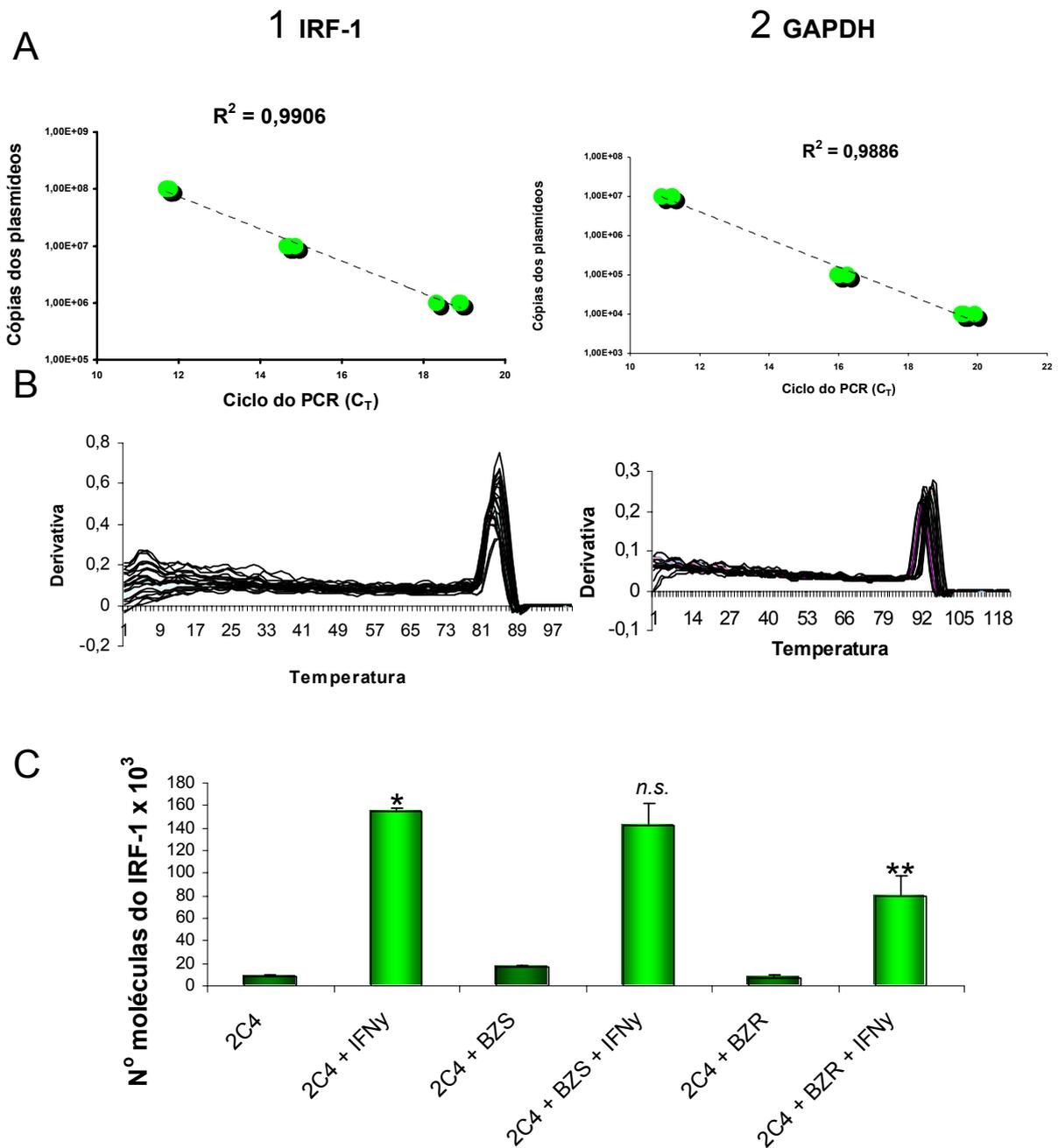


Figura 6 – Amplificação do cDNA dos genes IRF-1 e GAPDH por qPCR. **A** – Curva padrão obtida a partir da amplificação de diluições seriadas ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de cDNA do IRF-1 (**A1**) e da GAPDH (**A2**). Os gráficos mostram os valores de C_T obtidos para cada uma das diluições. **B** – Gráficos de dissociação mostram a especificidade da amplificação dos genes IRF-1 (**B1**) e da GAPDH (**B2**). **C** – Número relativo de moléculas do transcrito que codifica o gene do IRF-1 após normalização com a GAPDH em fibroblastos humanos 2C4 infectados com as populações BZS e BZR do *T. cruzi* e estimulados com 50U/ml de rIFN- γ . *: $p < 0,001$ comparado com 2C4; **: $p < 0,05$ e *n.s.*: **não significativo** ($p > 0,05$) comparado com 2C4 + IFN- γ ; Experimento representativo de três experimentos independentes que produziram resultados similares.

2.3.2 – Avaliação da expressão do mRNA do IRF-2

Uma vez que o IRF-2 é um fator envolvido na regulação negativa da ativação daIDO pelo IFN- γ avaliamos a participação deste fator no mecanismo utilizado pelo parasito para escapar da ação antimicrobiana do IFN- γ . Para isso, investigamos o efeito da infecção pelas populações BZS e BZR de *T. cruzi* sobre a expressão do mRNA do IRF-2 nos fibroblastos humanos 2C4 ativados pelo IFN- γ .

Os níveis de mRNA do gene do IRF-2 foram avaliados quantitativamente nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR e estimulados com rIFN- γ através de qPCR seguindo a metodologia descrita anteriormente para os genes da IDO e do IRF-1. Assim, foi obtida uma curva padrão utilizando diluições ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos de cDNA do IRF-2 (10^5 a 10^8 cópias - Figura 7A1) e da GAPDH (10^4 a 10^7 cópias - Figura 7A2). Ambas as retas apresentaram uma linearidade satisfatória, com os valores de $r^2 = 0,9929$ para o IRF-2 e 0,994 para a GAPDH para uma ampla faixa de concentração dos plasmídeos testada.

A Figura 7B mostra a curva de dissociação dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes do IRF-2 (B1) e da GAPDH (B2), evidenciando um único pico, demonstrando que somente um produto específico foi amplificado para cada gene. Os resultados mostraram que a estimulação das células com o rIFN- γ provocou um aumento de $2,15 \pm 0,53$ vezes na expressão do mRNA do IRF-2 ($P < 0,05$). Nos fibroblastos infectados pela população BZS do *T. cruzi* e estimulados com rIFN- γ (2C4 + BZS + rIFN- γ) não foram observadas diferenças significativas na expressão deste gene quando comparado com o controle (2C4 + rIFN- γ). Por outro lado, nas células infectadas com a população BZR e estimuladas com rIFN- γ (2C4 + BZR + rIFN- γ), um aumento significativo ($P < 0,05$) de $1,65 \pm 0,25$ vezes na expressão do mRNA do IRF-2 foi observado quando comparado com o controle (2C4 + rIFN- γ) (Figura 7C).

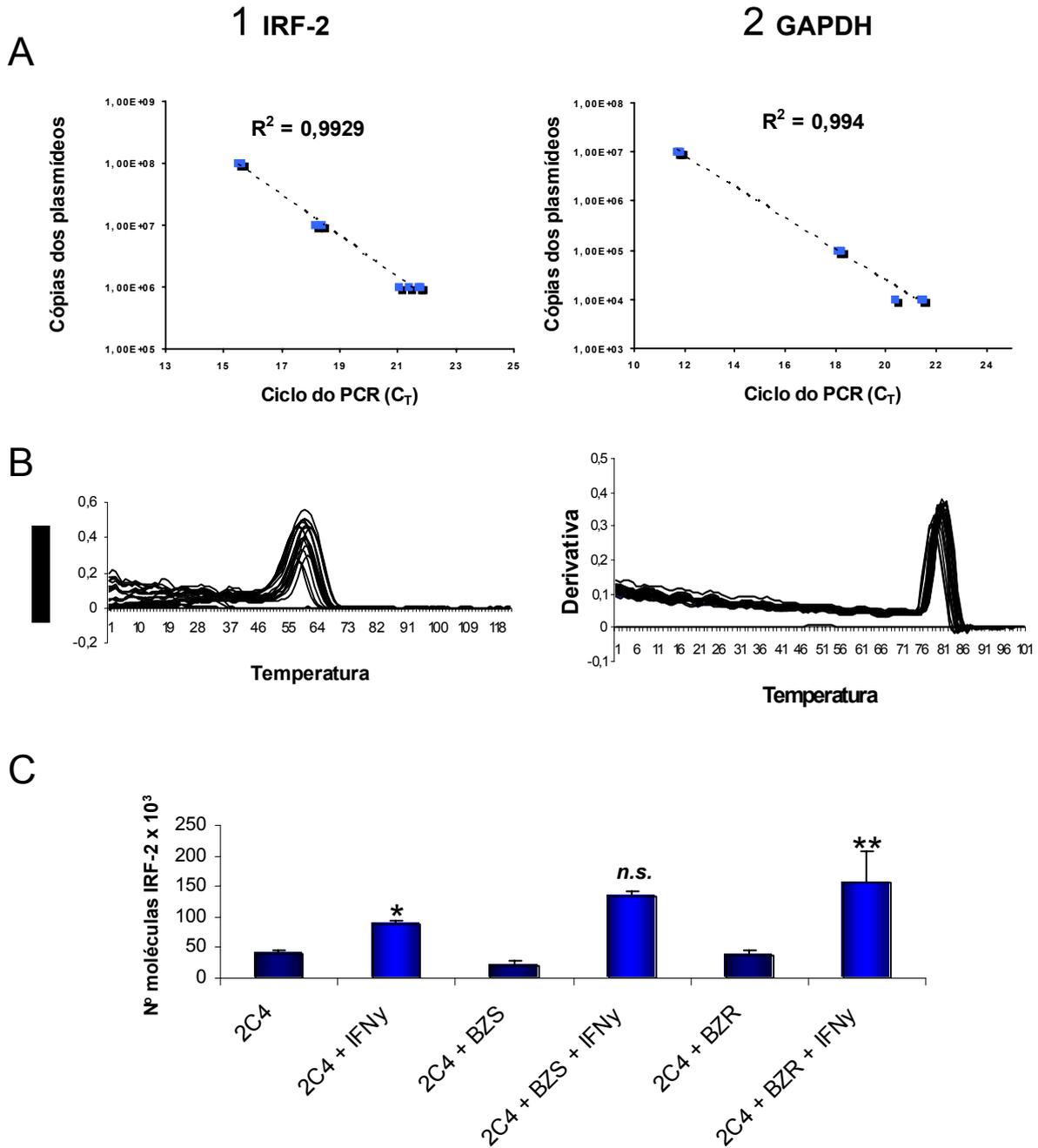


Figura 7 – Amplificação do cDNA dos genes IRF-2 e GAPDH por qPCR. **A** – Curva padrão obtida a partir da amplificação de diluições seriadas ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de cDNA do IRF-2 (**A1**) e da GAPDH (**A2**). Os gráficos mostram os valores de C_T obtidos para cada uma das diluições. **B** – Gráficos de dissociação mostram a especificidade da amplificação dos genes IRF-2 (**B1**) e da GAPDH (**B2**). **C** – Número relativo de moléculas do transcrito que codifica o gene do IRF-2 após normalização com a GAPDH em fibroblastos humanos 2C4 infectados com as populações BZS ou BZR de *T. cruzi* e estimulados com 50U/ml de rIFN- γ . *: $p < 0,05$ comparado com 2C4 ; **: $p < 0,05$ e *n.s.*: não significativo ($P > 0,05$) comparado com 2C4 + IFN- γ . Os resultados expressam a média e o desvio-padrão da média de duplicatas de dois experimentos independentes.

3 – Busca por proteínas tirosina-fosfatases (PTPs) de *T. cruzi* e de fibroblastos humanos

Como citado previamente, a via de transdução de sinal do IFN- γ envolve a participação de duas proteínas tirosina-quinases citoplasmáticas da família das quinases Janus (JAKs) e das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição STATs. A via segue uma cinética que envolve a ativação das JAKs 1 e 2 através da fosforilação de resíduos de tirosina nestas proteínas e a posterior fosforilação da STAT1 pelas JAKs ativadas. Assim, com o objetivo de investigar a participação de fosfatases do parasito e/ou da célula hospedeira no mecanismo de escape do *T. cruzi* à resposta mediada pelo IFN- γ , nos propusemos a buscar seqüências destas proteínas em bancos de dados e avaliar a expressão dos seus mRNAs em fibroblastos infectados com as populações de *T. cruzi* e estimulados com IFN- γ .

3.1 – Proteína tirosina-fosfatase de fibroblastos humanos

Dados da literatura mostram a implicação de uma proteína tirosina-fosfatase chamada SHP-1 na regulação negativa de várias cascatas de sinalização (revisado por Olivier et al., 2005). Com base nestes achados, fizemos uma busca de seqüências no banco de dados (*GenBank* – NCBI) e encontramos as seqüências de mRNA das três isoformas para a SHP-1. Posteriormente desenhamos iniciadores específicos para as regiões de maior similaridade entre elas na tentativa de obter um par de iniciadores que fosse capaz de detectar a SHP-1 nos fibroblastos humanos. Segundo dados da literatura a SHP-1 é abundantemente expressa em células da linhagem hematopoiética (p.e. macrófagos e monócitos) (Kozlowski et al., 1998). Assim, utilizamos como controle positivo da reação de RT-PCR cDNAs sintetizado a partir de RNA total extraído de monócitos (THP1) gentilmente cedidos pela estudante Fernanda de Oliveira Silva do laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou. Entretanto, não foi possível detectar a expressão do mRNA da SHP-1 nos fibroblastos e nem nos monócitos mesmo após várias tentativas alterando as concentrações dos reagentes e as temperaturas da reação de PCR. Vale ressaltar que a existe uma variabilidade no perfil de expressão gênica entre monócitos da linhagem THP1 que invalidam a utilização desta célula como um controle interno de expressão gênica. Sendo assim, outra linhagem celular deverá ser utilizada como controle positivo em experimentos de padronização para posteriormente avaliarmos a expressão da SHP-1.

3.2 – Proteína tirosina-fosfatase de *T. cruzi* (TcPTP).

A busca por seqüências de proteínas tirosina-fosfatases do *T. cruzi* resultou em apenas uma seqüência de aminoácidos de uma tirosina-fosfatase do parasito, localizada no cromossomo 3 do clone CL Brener sob o número de acesso: AC104489.1 e sob a definição Tcc1a22 (Figura 8).

```

1 mnnsgnnt nsggggnrgrdntlddgai ymkhmlvipr vslmeiwrpl tatdasmav
61 lrlqtrscrr vwlafeene lrrvcmeins glnasfgnlf lasaqrkwr talalvagdv
121 lpsphtpfyq qvlqnlvaf advesrrehr stasseqpsa tdgtevtppl eeekaeaqg
181 alkthfhw lyspmreymr qgiptrqwr scvnsrydhf ssypakfvvp ssldddelvq
241 sadlrargrv ealsyyylnt gagivraaqp aavnicasas kidvlksyrr asgmrvtfd
301 lrsrirayan tivgggfrim etgrycslan ihtvreayea lsaavldnnp tflavmraag
361 nmatsrkndt apvsspvgss tvespekaaa awiehihll rtatdaarli agvseedalp
421 paatgaaag aplnfmslg svsangfnsa gvnvvglnr fiprsstlyv wrrafrpipf
481 rtgnsgsigaa tagaprwleq qqnvqspps ytqpdnrkna rlvivncsdg wdrttqvcalf
541 tellldpyfr tvegfitlle kefvsfghpc llrsstlgsh sdwstgatvt dggfidihds
601 criptsencq sspiilqfld avhqllrlyp hcfefteafllivdlmhag ilgtfavnce
661 advyrwgief qtllsqffa vlfattirtd rhrpleaand genchdvee geeqeeqpt
721 etgffssav plhcfyqscg ggtalgtvgw dstpgsnpr mamtydaih sgllnphfsl
781 adnklffgpl ldvvrqpql lwerfflrhn fwceraakis qfseqsastv harvvestma
841 mtmphsaqpl letgpmlhpa tgerrpctns tvlmkptdls efsslkagq tvtlslvsnm
901 krkaigegif tpparltppn tvlpggrsea srsngqfapc tvprashgs laafssssss
961 fvgmqpqqehh qkqspssflq rgasgpvisg gytmngyhyns flgggmktrq spmkpsnnve
1021 fvaspcvsst ewtrhaqqks assepsgaqv rtyntllsml dqafe

```

Figura 8 – Seqüência de aminoácidos da proteína tirosina-fosfatase de *T. cruzi*.

Esta seqüência de aminoácidos foi convertida em nucleotídeos com o auxílio do software GeneTool (BioTools Inc.) usando o códon de uso de tripanosomatídeos. Posteriormente, identificamos o domínio catalítico dessa proteína e desenhamos iniciadores específicos para um fragmento de 116pb localizado dentro desse domínio. O desenho dos iniciadores foi realizado com o auxílio do software Primer Express (Applied Biosystems).

```

...atcctgcgaagtttgcgtgcccagattcttttagacgatgacgagttggttcagtcggcgggatctgcccgtcgcggttagggtggaagcgt
ttcttactactatattgaacactgggctggaattgttcgtgcccagccagctgccgtcaatatttgcgtccgcataaaatagacgtc
ctaaatcgtaccggcgtgcaagtgccatgcgggtgtgtacttttgatctccgcagccgaatacgcgctatgcgaacacaattgttggcggag
gcttccgaatcatggagacaggacggctactctcttgcaaacatctcataccgtgagagggcgtatgaggcacttctgcagcagtggttga
caacaacccaacgtttcttctgctgttatgcccgtgaggttaacatggcgacatcacggaaagataaactgcaccggtgctgctgcctgttggc
tcatccacggttgaatcaccggaagggccgcagcggcttgattgaacacatctcatggtcttctcgcgtaccgctacggatgcggcacgctca
tagcgggtgttctgaggaagatgcacttccgcctgcccaccggcggcagctggtggcggcccgcgtgaactttatgactcactcgggag
cgtgctggccaatggatttaattctgcccgcgtgaacggttggcggcctcaatgatc...

```

Figura 9 – Seqüência do domínio catalítico da proteína tirosina-fosfatase de *T. cruzi*, mostrando os iniciadores senso e anti-senso. A parte sublinhada mostra o fragmento amplificado de 116pb.

4 – Avaliação da expressão do mRNA da TcPTP

A expressão da TcPTP em fibroblastos humanos infectados com as populações BZS ou BZR do *T. cruzi* e estimulados com rIFN- γ foi avaliada por RT-PCR e qPCR.

A Figura 10 mostra o perfil de amplificação do cDNA da TcPTP em fibroblastos 2C4 infectados com as populações BZS ou BZR de *T. cruzi* obtido por RT-PCR. Como esperado, a expressão do mRNA da TcPTP não foi observada nos fibroblastos não infectados, confirmando a especificidade dos iniciadores desenhados para a enzima do parasito. A estimulação com IFN- γ não alterou a expressão do mRNA da TcPTP nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR.

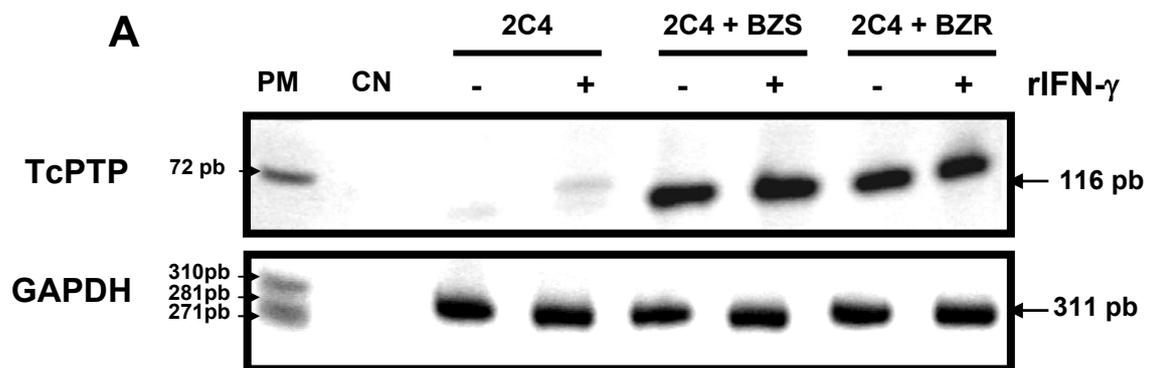


Figura 10 - RT-PCR do gene TcPTP (116pb) em gel de poliacrilamida 8% corado pela prata.

A expressão da TcPTP foi avaliada quantitativamente nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR e estimulados com rINF- γ através de qPCR. Uma curva padrão foi obtida utilizando diluições ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos de cDNA da TcPTP (10^3 a 10^6 cópias - Figura 11A1) e da GAPDH (10^4 a 10^7 cópias - Figura 11A2). Ambas as retas apresentam uma linearidade satisfatória, com os valores de $r^2 = 0,9965$ para o TcPTP e de $0,9848$ para a GAPDH para uma ampla faixa de concentração dos plasmídeos testada. A figura 11B mostra a curva de dissociação dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes da TcPTP (B1) e da GAPDH (B2), evidenciando um único pico, demonstrando que somente um produto específico foi amplificado para cada gene. A Figura 11C mostra o perfil de amplificação do cDNA da TcPTP por qPCR. Não observamos alterações significativas (redução de $2,3 \pm 1,16$ e $1,3 \pm 0,1$ vezes respectivamente) na expressão do mRNA da TcPTP nas células infectadas com as populações BZS ou BZR após a estimulação com rINF- γ . Os resultados obtidos com a qPCR mostraram que a expressão do mRNA da TcPTP nas células infectadas com a população BZS comparada à expressão nas células infectadas com a população BZR não foi significativamente diferente ($1,2 \pm 0,03$ vezes maior na população BZS).

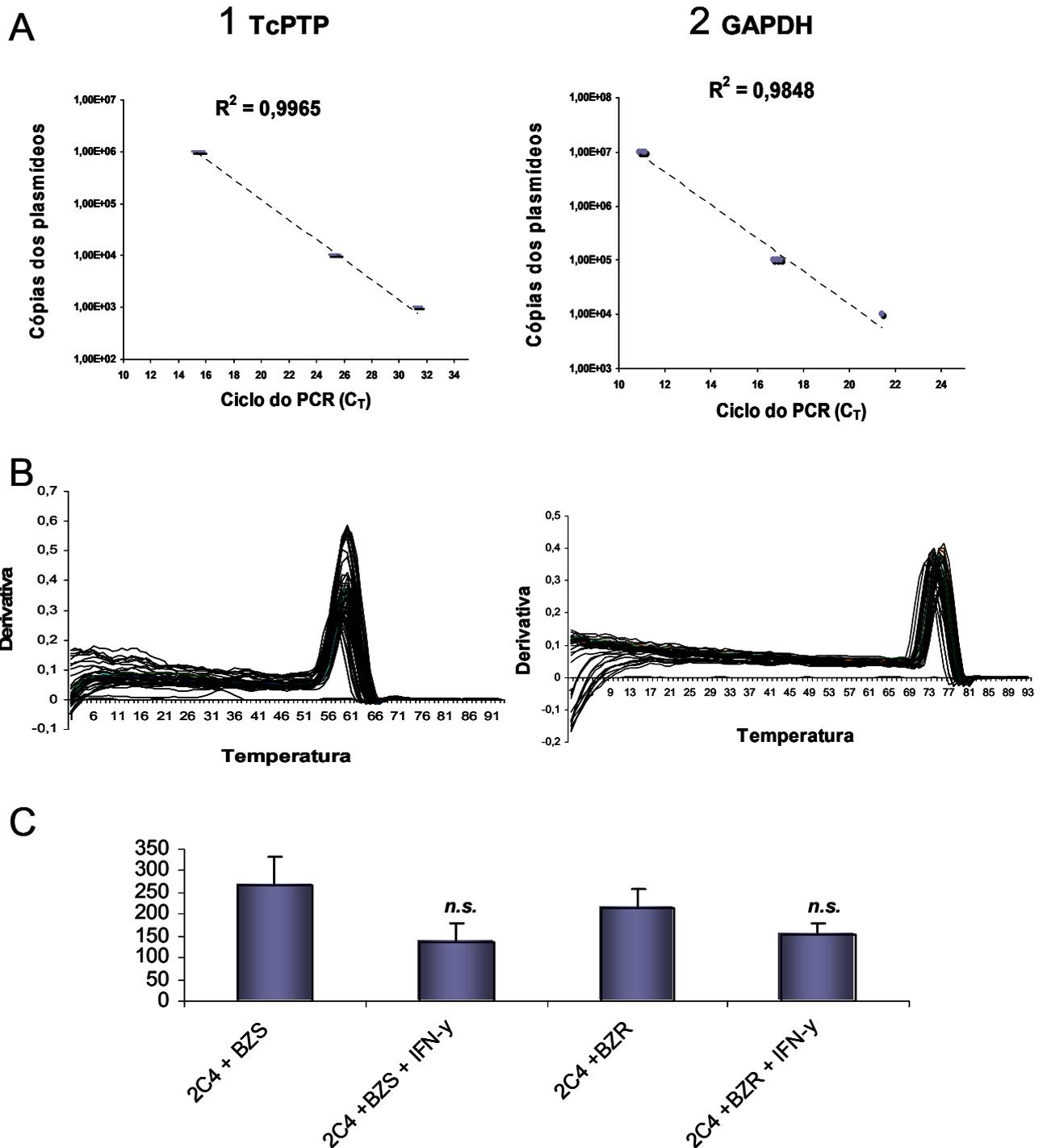


Figura 11 – Amplificação do cDNA dos genes TcPTP e GAPDH por RT-qPCR. **A** – Curva padrão obtida a partir da amplificação de diluições seriadas ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de cDNA da TCPTP (**A1**) e da GAPDH (**A2**). Os gráficos mostram os valores de C_T obtidos para cada uma das diluições. Gráficos de dissociação mostram a especificidade da amplificação dos genes TcPTP (**B1**) e da GAPDH (**B2**). **C** – Número relativo de moléculas do transcrito que codifica o gene do TcPTP após normalização com a GAPDH em fibroblastos humanos 2C4 infectados com as populações BZS e BZR do *T. cruzi* e estimulados com 50U/ml de rIFN- γ . Os resultados expressam a média e o desvio-padrão da média de triplicatas de dois experimentos independentes.

Com o objetivo de identificar diferenças na expressão da TcPTP entre as populações BZS e BZR de *T. cruzi* mostrados pelos resultados anteriores, avaliamos a expressão do mRNA da TcPTP nestas populações através de qPCR. Para isso, utilizamos cDNAs obtidos a partir da extração de RNA de formas epimastigotas do parasito provenientes de cultura em meio LIT mantidas em nosso laboratório. Para a extração do RNA, 10^9 parasitos foram contados em câmara de Neubauer centrifugados e o sedimento ressuspendido em 1ml TRizol. A extração do RNA foi realizada segundo a metodologia descrita no item 6 do Material e Métodos. A quantidade de RNA total nas diferentes amostras foi normalizada a partir da expressão do gene constitutivo Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase de *T. cruzi* (TcHGPRT).

A Figura 12 mostra as curvas padrão da TcPTP (A1) e da TcHGPRT (A2) obtidas utilizando diluições ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo os fragmentos de cDNA destes genes (10^3 a 10^6 cópias para a TcPTP e 10^5 a 10^8 cópias – para a TcHGPRT). Ambas as retas apresentaram uma linearidade satisfatória, com os valores de $r^2 = 0,9991$ e $0,9895$ respectivamente, para uma ampla faixa de concentração dos plasmídeos testada.

As Figuras 12B1 e B2 mostram respectivamente a curva de dissociação dos produtos de PCR amplificados com os iniciadores específicos para os genes da TcPTP e da TcHGPRT, evidenciando um único pico, demonstrando que somente um produto específico foi amplificado para cada gene. A Figura 12C mostra o perfil de amplificação do cDNA das formas epimastigotas das populações BZS e BZR de *T. cruzi*. Os resultados mostram que a população BZS do *T. cruzi* apresentou um aumento significativo ($P = 0,0498$) de $2,46 \pm 0,48$ na expressão do mRNA da TcPTP em relação ao seu par resistente BZR.

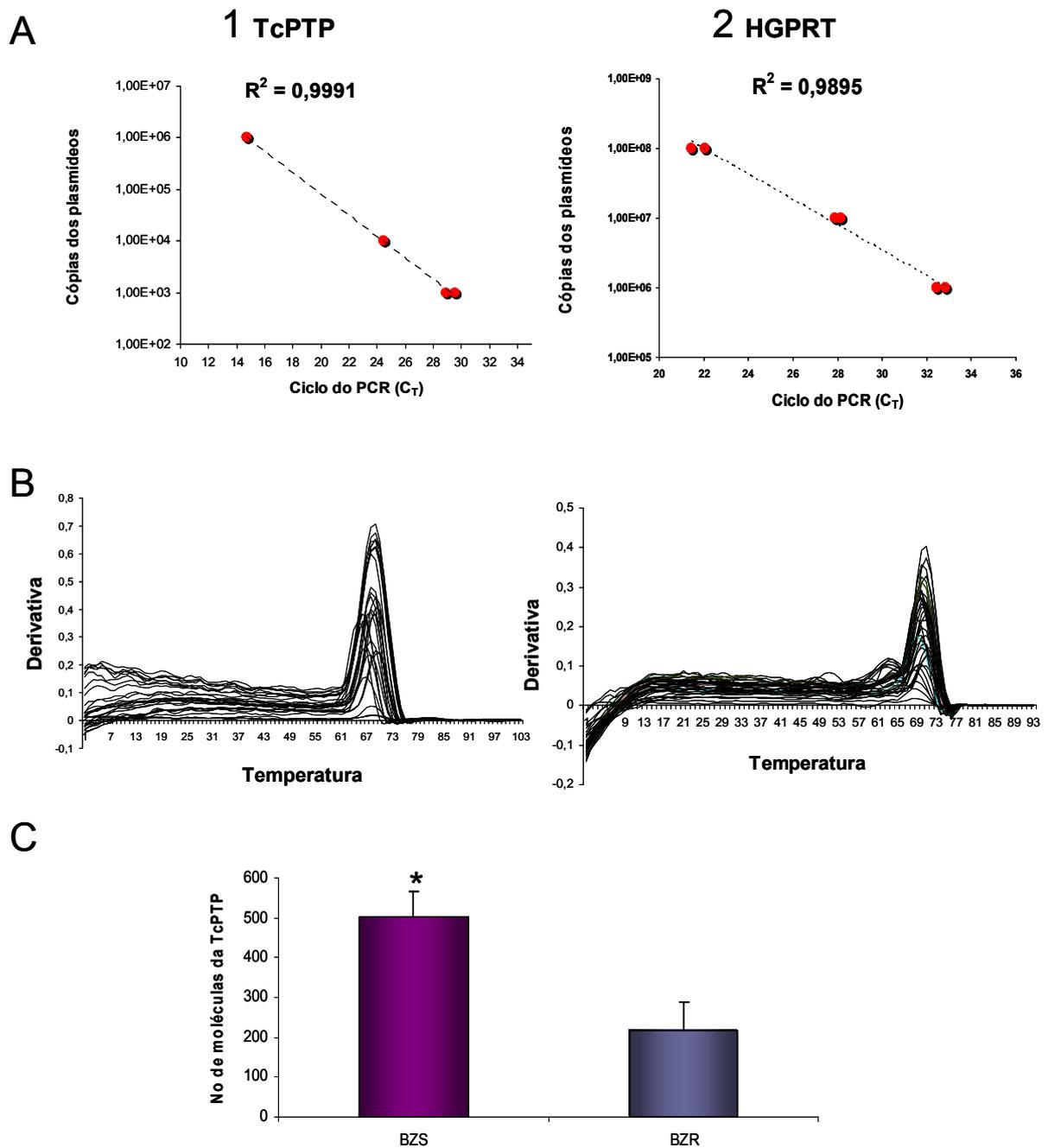


Figura 12 – Amplificação do cDNA dos genes TcPTP e HGPRT por qPCR. **A** – Curva padrão obtida a partir da amplificação de diluições seriadas ao décimo dos plasmídeos recombinantes contendo o fragmento de cDNA da TcPTP (**A1**) e da HGPRT (**A2**). Os gráficos mostram os valores de C_T obtidos para cada uma das diluições. Gráficos de dissociação mostram a especificidade da amplificação dos genes TcPTP (**B1**) e da HgPRT (**B2**). **C** – Número relativo de moléculas do transcrito que codifica o gene do TcPTP após normalização com a HgPRT em formas epimastigotas das populações BZS e BZR de *T. cruzi*. *: $p < 0,05$ comparado com a população BZR. Os resultados expressam a média e o desvio-padrão da média de duplicatas de dois experimentos independentes.

Discussão

A quimioterapia específica da doença de Chagas está limitada ao Benzonidazol (BZ) e nifurtimox (NFX) sendo este último já não mais comercializado no Brasil. Ambos os compostos quando ministrados na fase aguda da doença permitem a cura parasitológica em 60% dos pacientes tratados. Entretanto sua eficácia na fase crônica é muito baixa (entre 6 a 10% de cura) (Urbina & DOcampo, 2003). Além disso, essas drogas apresentam diversos efeitos colaterais. Diferenças na susceptibilidade de cepas do *T. cruzi* a drogas já foram demonstradas por diversos autores. Filardi & Brener (1987) descreveram a existência de cepas com resistência natural ao BZ e ao NFX. Tem sido sugerido que a resistência natural de cepas do *T. cruzi* a derivados nitroheretrocíclicos pode ser um fator importante para explicar as baixas percentagens de cura detectadas em pacientes chagásicos crônicos.

O estudo dos mecanismos de resistência a drogas é muito importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes na cura de várias doenças. Ele fornece conhecimentos sobre os alvos intracelulares das drogas e os mecanismos de defesa da célula do hospedeiro ou do parasito, permitindo o desenvolvimento de análogos da droga que não são afetados por estes mecanismos além de direcionar de maneira racional o uso da droga e as combinações para diminuir ou prevenir o desenvolvimento de resistência.

Na tentativa de criar um modelo para o estudo da resistência a drogas, vários trabalhos relatam a seleção de cepas de *T. cruzi* resistentes *in vitro* a drogas (Dvorak & Howe 1977; Nozaki, Engel & Dvorak, 1996; Nirdé et al., 1995). Porém, a correlação entre a susceptibilidade de cepas de *T. cruzi* entre os sistemas *in vitro* e *in vivo* não foi observada (Scott & Matthews, 1987; Neal & Van Bueren, 1988; Ribeiro-Rodrigues et al., 1995). Em 1998, Murta & Romanha fizeram a seleção *in vivo* de uma população de *T. cruzi* com resistência ao BZ (BZR) a partir da população selvagem da cepa Y do *T. cruzi*. Essa população apresentou resistência ao tratamento com BZ. Murta et al. (1999) também estudaram a variabilidade genética das populações BZS e BZR através de RAPD com três iniciadores aleatórios. Os autores mostraram que os perfis produzidos pelas populações BZS e BZR eram idênticos, independentemente da susceptibilidade ao BZ sugerindo uma alta similaridade genômica entre essas duas populações. Os autores mostraram ainda que o fenótipo de resistência a drogas da população BZR mantido na ausência da droga foi estável após uma passagem no vetor *Triatoma infestans*, após manutenção em meio LIT por seis meses e após nove passagens em camundongos. Entretanto, pouco se sabe sobre a estabilidade do fenótipo de resistência ao BZ nas formas tripomastigotas mantidas em cultura de células. Diante desses dados, foi de fundamental importância para o nosso estudo avaliar esta estabilidade na população BZR frente ao seu par sensível BZS após passagens seriadas dessas populações em cultura de fibroblastos humanos na ausência da droga. Para isso, o ensaio de susceptibilidade *in vitro* (IC₅₀) ao benzonidazol foi realizado.

Nossos resultados, apresentados na Tabela 2, mostraram que após 8 passagens em cultura de fibroblastos sem a pressão da droga, a população BZR foi duas vezes mais resistente ao BZ comparado ao seu par sensível indicando que o fenótipo de resistência previamente observado *in vivo* por Murta & Romanha (1998) se manteve no sistema *in vitro* utilizado. Este resultado confirma a qualidade do modelo experimental utilizado neste estudo constituindo um bom modelo para o estudo do mecanismo de resistência a drogas em *T. cruzi*.

O estudo da interação da quimioterapia com o sistema imune do hospedeiro é fundamental para o entendimento dos mecanismos de resistência a drogas. Estudos recentes sugerem que a ativação do sistema imune durante a quimioterapia pode intensificar a eficácia do Benzonidazol (BZ) contra a infecção pelo *T. cruzi*. Michailowsky et al. (1998) mostraram que a associação da quimioterapia com a administração de IL-12 recombinante, uma potente indutora de IFN- γ em macrófagos, intensificou a eficácia do BZ no tratamento de camundongos infectados com o *T. cruzi*. Estes achados estão em consonância com os resultados de Bahia et al. (2000) que observaram uma maior produção de IFN- γ nos pacientes chagásicos tratados com BZ curados em relação aos não curados. Recentemente, um estudo realizado em nosso laboratório utilizando camundongos *knockouts* para várias citocinas, demonstrou que a ativação do sistema imune pelo parasito e IFN- γ endógeno têm um papel essencial na eficácia do BZ no tratamento camundongos infectados com *T. cruzi* (Romanha et al., 2002).

O uso de modelos murinos para estudar a resposta imune na doença de Chagas tem identificado um papel importante de linfócitos T na resistência à infecção (Araújo, 1989; Kierszenbaum, 1995; Martin & Tarleton, 2005). O efeito protetor das células T na doença de Chagas é muito provavelmente devido à produção de IFN- γ por estas células (revisado por Martin & Tarleton, 2004). O IFN- γ tem um papel crucial na resistência do hospedeiro contra a infecção por patógenos. Ele é produzido primariamente por células T auxiliares do subtipo Th1 ativadas, células NK e células T citotóxicas do fenótipo 1 em resposta a infecções e está envolvido em uma variedade de processos celulares. Dentre estes processos está a ativação dos mecanismos antimicrobianos de macrófagos essenciais para a eliminação de *T. cruzi* e de outros patógenos intracelulares. Em células fagocíticas não profissionais (células que não são especializadas em apresentar antígenos aos linfócitos T) como as células endoteliais, fibroblastos, o principal mecanismo antimicrobiano ativado pelo IFN- γ é a indução dos mecanismos de depleção de nutrientes essenciais à sobrevivência do patógeno. Entre eles está a indução da Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e a conseqüente degradação do aminoácido essencial triptofano (TRP).

A IDO é uma enzima indutível encontrada em praticamente todos os tecidos do corpo e está envolvida no catabolismo do TRP (Taylor et al., 1991). Sua indução *in vitro* e *in vivo*

leva a uma rápida depleção do TRP intracelular. A indução da expressão da IDO tem sido indicada como mecanismo responsável pelo efeito antiproliferativo do $\text{INF-}\gamma$ em células tumorais (Taylor & Feng, 1991), pela inibição do crescimento de patógenos intracelulares (Pfefferkorn, 1984) e posteriormente descrita como crucial para o estabelecimento da tolerância imunológica na gravidez (Munn et al. 1998). Trabalhos realizados com células mutantes derivadas de células de carcinoma cervical humano ME-180 estimuladas com $\text{INF-}\gamma$ mostraram que estas células não foram capazes de inibir a proliferação celular ou de suprimir o crescimento intracelular de *Toxoplasma gondii* (Feng & Taylor, 1989) e de *Chlamydia psittaci* (Thomas et al., 1993) e que esta disfunção estava relacionada à deficiência na indução da IDO nestas células.

Recentemente em nosso laboratório, Cerávolo e colaboradores (1999) estudaram o papel da degradação do TRP pela IDO no controle da multiplicação intracelular de formas amastigotas da cepa Y de *T. cruzi* e da cepa RH de *T. gondii* em fibroblastos humanos estimulados com $\text{rINF-}\gamma$. Os resultados mostraram que ao contrário do *T. gondii*, a replicação de amastigotas de *T. cruzi* nestas células não foi inibida pelo $\text{rINF-}\gamma$. Posteriormente, com o objetivo de tentar esclarecer porque o *T. cruzi* é insensível à depleção do triptofano induzida por $\text{rINF-}\gamma$ em fibroblastos humanos, Chaves *et al.*, (1998) investigaram o metabolismo do TRP a nível bioquímico e molecular. Os resultados mostraram que a infecção de fibroblastos humanos com a cepa Y do *T. cruzi* inibiu parcialmente o catabolismo do TRP induzida pelo $\text{rINF-}\gamma$ e que o *T. cruzi* foi capaz de bloquear parcialmente a ativação transcricional da IDO induzida pelo $\text{rINF-}\gamma$. A inibição da expressão do mRNA da IDO foi diretamente relacionada com o tempo de incubação e o número de parasitas utilizados na infecção das células. Chaves *et al.* (2001) estudaram o efeito da infecção pelo *T. cruzi* na expressão de genes induzidos por $\text{INF-}\gamma$ (ISGs) em fibroblastos humanos através de RT-PCR. Os autores observaram que a infecção pelo parasito produziu uma diminuição da expressão do mRNA do antígeno leucocitário HLADR- β , não alterou a expressão do mRNA do IRF-1 e aumentou a expressão do mRNA do IRF-2. O fato do *T. cruzi* inibir a transcrição gênica do HLADR- β mostrou que o parasito não está bloqueando apenas a via de ativação específica para a IDO, mas está interferindo de modo geral na ativação de genes induzidos pelo $\text{INF-}\gamma$. Uma vez que o IRF-2 é um fator que inibe a transcrição gênica ativada pelo $\text{INF-}\gamma$, o aumento observado na sua expressão, induzido pelo *T. cruzi*, pode estar envolvido na inibição da expressão dos genes da IDO e do HLADR- β em fibroblastos humanos.

Os ensaios de RT-PCR têm sido utilizados com sucesso na avaliação da expressão de mRNAs de fontes diferentes. Entretanto, para se obter resultados semiquantitativos é extremamente importante que o produto de PCR seja medido durante a fase exponencial da reação antes que seja alcançada a saturação. Esta é a maior limitação dessa técnica, pois

isso exigiria a interrupção da reação de PCR após um número de ciclos determinado experimentalmente. O PCR quantitativo em tempo real (*Real Time Quantitative Reverse Transcriptase PCR* [qPCR]) (Heid et al., 1996; Gibson et al., 1996) é uma técnica muito potente e refinada que combina a amplificação por PCR e a detecção do produto em um único passo pela determinação contínua do produto amplificado formado durante a fase exponencial da PCR permitindo uma quantificação precisa dos níveis de mRNAs, até mesmo nos casos de mRNAs que são expressos em níveis muito baixos na célula. Através da construção de plasmídeos com clones cDNAs dos genes de interesse, curvas padrão podem ser geradas o que permite a quantificação direta de qualquer amostra desconhecida. Além disso, diferenças na quantidade de RNA e na eficiência da síntese de cDNA podem ser corrigidas pela normalização com genes constitutivos como a GAPDH ou a β -actina.

Com o objetivo de avaliar de forma quantitativa a expressão de genes estimulados por IFN- γ ISGs envolvidos nos mecanismos de escape do *T. cruzi* em fibroblastos 2C4 infectados com as populações BZS ou BZR utilizamos a técnica de qPCR mais precisa do que a RT-PCR. Nossos resultados mostraram que a infecção dos fibroblastos tanto com a população BZR quanto com a BZS de *T. cruzi* reduziu em média três vezes a expressão do mRNA daIDO induzida por rIFN- γ e que não foram detectadas diferenças significativas na expressão do mRNA daIDO entre os fibroblastos infectados com as populações BZS e BZR (Figura 5C). Esses resultados confirmam os resultados previamente obtidos utilizando a RT-PCR em nosso laboratório com a cepa Y de *T. cruzi* comprovando que o parasito inibe parcialmente a transcrição da enzima de degradação do TRP e mostram que esta inibição não foi diferente nas células infectadas com as populações resistentes ou sensíveis do parasito.

Considerando que a IDO é um produto final na cascata de transdução de sinal ativada pelo IFN- γ , passamos a avaliar a expressão de outros componentes envolvidos nas etapas anteriores dessa sinalização com o objetivo de investigar a participação destes componentes na inibição da expressão do mRNA daIDO e na conseqüente sobrevivência do parasito dentro dos fibroblastos humanos. A expressão dos IRFs é induzida não somente por vírus, mas também por interferons e desempenha um importante papel na regulação do sistema imune inato e adquirido. Chon et al. (1996) mostraram que STAT1 e IRF-1 atuam cooperativamente para mediar a expressão da IDO por IFN- γ , e que camundongos *knockouts* para IFN- γ ou IRF-1 foram incapazes de expressar a IDO. Esses resultados indicam que a indução da IDO pelo IFN- γ é completamente dependente de IRF-1. O IRF1 além de ser um fator importante para a ativação da transcrição de genes induzidos pelo IFN γ está associado diretamente com os efeitos antimicrobianos e antiproliferativos desta citocina. Estudos realizados em camundongos deficientes para IRF-1 (IRF1^{-/-}) têm evidenciado a importância deste fator para a indução de genes ativados por IFN α , β e γ ,

para o desenvolvimento de uma resposta Th1 e conseqüentemente para a resistência contra infecções por patógenos intracelulares entre eles; *Leishmania major* (Stenger et al, 1994) e *Plasmodium berghei* (Tan et al., 1999). Fibroblastos embrionários obtidos de camundongos IRF1^{-/-} foram mais susceptíveis à infecção pelo vírus da encefalomiocardite (EMCV) comparados com fibroblastos normais (Kimura et al, 1994). Park et al. (2000) demonstraram que a Oncoproteína E7 do vírus do papiloma humano (HPV), agente etiológico da displasia cervical e do câncer cervical, interage diretamente com IRF-1 de células NIH-3T3 e interfere com a atividade antitumoral desse fator, constituindo um importante mecanismo de subversão do sistema imune pelo vírus.

Neste trabalho, avaliamos a expressão do mRNA dos fatores IRF-1 nos fibroblastos humanos infectados com as populações BZS ou BZR e posteriormente estimulados com rIFN- γ . Nossos resultados mostraram que a infecção das células 2C4 com os parasitos sensíveis e a posterior estimulação com rIFN- γ (2C4 + BZS+ IFN- γ) não causou alterações significativas na expressão do IRF-1 quando comparado à expressão deste fator nas células não-infectadas e estimuladas com rIFN- γ (2C4 + IFN- γ). Por outro lado, a infecção com os parasitos resistentes e a posterior estimulação com rIFN- γ (2C4 + BZR+ IFN- γ) causou uma diminuição significativa na expressão do mRNA do IRF-1 (Figura 6C). Este resultado sugere que parasitos resistentes por induzir uma expressão menor de IRF-1 possam modular a transcrição dos ISGs impedindo dessa forma a transcrição de genes envolvidos nos mecanismos antimicrobianos induzidos na célula hospedeira pelo IFN- γ .

Alterações na expressão do IRF-1 em células infectadas por patógenos têm sido descritas. A expressão do IRF-1 em pneumócitos humanos do tipo II (A549) durante a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* foi estudada por Ichikawa et al. (2000). Utilizando a metodologia de microarranjos de cDNA, os autores identificaram o IRF-1 como um dos genes que foram diferencialmente expressos nas células A549 durante a infecção com *P. aeruginosa*. IRF-1 teve sua expressão aumentada de três a quatro vezes nestas células após a aderência do patógeno. Mais recentemente, Balaraman et al. (2004) estudaram os efeitos na atividade de ligação ao DNA dos IRFs após a infecção por *Leishmania donovani* em macrófagos murinos. Os autores mostraram que *L. donovani* e sua molécula de superfície lipo-fosfoglicano (LPG) aumentam a atividade de ligação ao DNA do IRF-1 nestas células de uma maneira dose-dependente sugerindo que o IRF-1 esteja envolvido na resposta à infecção por *L. donovani* e que o aumento na sua atividade ativadora seja um mecanismo de defesa do hospedeiro.

O IRF-2 é um fator expresso constitutivamente em vários tipos celulares. Ele possui estrutura similar ao IRF-1 e compete pelos mesmos sítios de ligação na região promotora dos ISGs atuando porém como um antagonista ao IRF-1 na ativação transcricional da IDO pelo IFN- γ (Harada et al., 1989). Blanco et al. (2000), mostraram que o IRF-2 foi capaz de

inibir a expressão de Ciclooxygenases, principais enzimas mediadoras do processo inflamatório induzidas por IRF-1/IFN- γ *in vivo*.

Os resultados da análise da expressão do mRNA do IRF-2 por qPCR mostraram que a infecção dos fibroblastos humanos com a população BZR de *T. cruzi* e a estimulação com IFN- γ por 24 horas (2C4 + BZR + rIFN- γ) causaram um aumento na expressão do mRNA deste fator comparado com o controle (2C4 + rIFN- γ) (Figura 7C). Uma vez que o IRF-2 é um fator repressor da ativação transcricional da IDO pelo IFN- γ , o aumento na expressão de seu mRNA, induzido pelo *T. cruzi*, pode estar envolvido na inibição da expressão do gene da IDO observado em fibroblastos humanos infectados, o que poderia explicar parte do mecanismo de evasão do *T. cruzi* à ação antimicrobiana induzida pelo IFN- γ nestas células. Dessa forma, nossos resultados confirmam os dados observados por Chaves et al. (2001) relativos a expressão desse fator. Recentemente, dados similares relativos à expressão do mRNA do IRF-2 foram publicados por De Avalos et al. (2002). Os autores estudaram as conseqüências da infecção com o *T. cruzi* na expressão de genes de fibroblastos humanos usando a técnica de microarranjo de alta densidade e observaram que nas primeiras 6 horas de infecção com o parasito nenhum gene teve sua expressão alterada. Porém, um aumento significativo na expressão de 106 genes, entre eles o IRF-2, foi observado 24 horas após a infecção. O fato da expressão do mRNA do IRF-2 ter sido aumentada nas células infectadas com a população BZR sugere que esta população esteja interferindo negativamente na transcrição dos ISGs via IRF-2.

Um dos mecanismos utilizados por patógenos para inibir as funções antimicrobianas de macrófagos consiste na ativação das proteínas tirosina-fosfatases (PTPs) destas células (revisado por Olivier et al., 2005). O envolvimento de fosfatases no bloqueio da resposta ao IFN- γ por patógenos tem sido descrito na literatura. Nandan & Reiner (1995) estudaram os efeitos da infecção por *L. donovani* em macrófagos derivados de monócitos U-937 e mostraram que a estimulação destas células com IFN- γ provocou uma rápida fosforilação de JAK1, JAK2 e STAT1 de uma maneira dose-dependente. Todavia, a infecção com *L. donovani* inibiu severamente a fosforilação de tirosinas das JAKs e da STA1. Esta inibição foi seletiva uma vez que a fosforilação de outras tirosinas celulares induzidas pelo IFN- γ não foi afetada pela infecção com o parasito. Olivier et al., (1998) estudaram o efeito do Peroxivanadium, um inibidor de PTP, na interação parasito-hospedeiro utilizando macrófagos infectados com *L. donovani*. Os autores mostraram que a modulação dos eventos dependentes de fosforilação de tirosinas com o inibidor foram capazes de controlar a infecção por *Leishmania*. Além disso, o tratamento de macrófagos infectados com o inibidor resultou em um aumento da sensibilidade destas células à estimulação com IFN- γ , que foi refletida em uma maior expressão do mRNA da iNOS e uma maior produção de NO e conseqüentemente em uma maior eliminação dos parasitos intracelulares. Yuan et al.

(1998) mostraram que o pré-tratamento de fibroblastos humanos com staurosporina, um inibidor de PTK, por 2 horas antes da estimulação com IFN γ causou uma redução dose-dependente da expressão daIDO nestas células. Mais recentemente, Teixeira & Mann (2002) demonstraram que *Entamoeba histolytica* também é capaz de induzir a expressão de PTPs e a conseqüente desfosforilação de proteínas da cascata de sinalização celular ocasionando a morte de células T de leucemia humana (Jukart) do hospedeiro. Resultados obtidos por Zhong et al. (1998) demonstraram que o *T. cruzi* sintetiza enzimas com atividade fosfatase que catalisam a desfosforilação de resíduos de tirosina fosforilados. Mais especificamente, os autores mostraram que a invasão de mioblastos da linhagem L₆E₉ pelo *T. cruzi* foi significativamente reduzida na presença dos inibidores de PTP: ortovanadato de sódio e cloreto de zinco. Estes resultados sugerem um importante papel da desfosforilação de tirosinas na invasão de células do hospedeiro pelo *T. cruzi*. Recentemente, em nosso laboratório, Chaves e colaboradores avaliaram a atividade tirosina-fosfatase em lisados protéicos preparados a partir de fibroblastos 2C4 infectados com cepa Y de *T. cruzi* estimulados ou não com o rIFN- γ . Os resultados mostraram que fibroblastos infectados com o *T. cruzi* apresentaram um aumento da atividade tirosina-fosfatase em relação aos fibroblastos não infectados independente da estimulação com IFN- γ (comunicação pessoal). Este achado sugere que o *T. cruzi* seja capaz de produzir fosfatases, ou induzir fosfatases da própria célula hospedeira, que podem interferir na fosforilação de moléculas importantes na via de transdução de sinal do IFN- γ e, portanto, seja capaz de bloquear a transcrição gênica ativada por esta citocina nestas células. Dentro desse contexto dados da literatura demonstram que a ativação de uma fosfatase da célula hospedeira chamada SHP-1 parece ser responsável pelas alterações nas cascatas de sinalização durante infecções. A SHP-1 é uma PTP abundantemente expressa em células da linhagem hematopoiética (p.e. macrófagos e monócitos) e tem sido implicada na regulação negativa de várias cascatas de sinalização. O papel da SHP-1 como um regulador negativo crítico da fosforilação de tirosinas e da transdução de sinal tem sido descrito em camundongos com deficiência na atividade desta enzima. Ao nível celular, estes camundongos tiveram um aumento na fosforilação de proteínas em células hematopoiéticas, na mielopoiese e na hipersensibilidade a estímulos extracelulares. Estes eventos podem ser atribuídos a deficiências na atividade fosfatase de SHP-1. Promastigotas de *L. donovani* podem rapidamente acionar a atividade de PTPs do hospedeiro simultaneamente com uma inibição das PTKs. Macrófagos infectados com *L. donovani* demonstraram aumento na atividade de SHP-1 correlacionada com a diminuição da resposta a citocinas pro-inflamatórias, redução da produção de NO e a sobrevivência prolongada de parasitos intracelulares (Revisado por Nandan & Reiner, 2005 e Olivier et al., 2005). Ray et al. (2000) estudaram a via de transdução do IFN- γ em monócitos (U-937) diferenciados com PMA infectados por

L. donovani. Os autores mostraram que a fosforilação dos receptores de IFN- γ (IFN- γ R) e formação do complexo IFN- γ R1 e IFN- γ R2 foram significativamente inibidas após 24 horas de infecção com o parasito.

Diante disso, neste trabalho utilizamos a técnica de qPCR para avaliar quantitativamente a expressão das proteínas tirosina-fosfatases humana (SHP-1) e de *T. cruzi* (TcPTP) nos fibroblastos infectados com parasitos sensíveis e resistentes, a fim de investigar a participação destas proteínas no mecanismo de evasão do parasito à resposta mediada pelo IFN- γ e no fenótipo de resistência a drogas. Para isso desenhamos iniciadores específicos para cada gene, onde inicialmente, foi realizada uma busca em banco de dados de seqüências (*GenBank* - NCBI) e encontramos três isoformas para a SHP-1. Estas seqüências foram alinhadas e foram desenhados iniciadores específicos para as regiões de similaridade entre elas na tentativa de se obter um par de iniciadores que fosse capaz de detectar a SHP-1 nos fibroblastos humanos. Uma vez que segundo a literatura, a SHP-1 é abundantemente expressa em macrófagos e monócitos utilizamos como controle positivo da reação o cDNA sintetizado a partir de RNA total extraído de monócitos (THP1). Entretanto, apesar de termos realizado várias tentativas alterando as variáveis da técnica, não foi possível detectar o mRNA da SHP-1 nos fibroblastos e nem nos monócitos. Este fato pode ser atribuído a problemas na produção ou pureza dos iniciadores, uma vez que as seqüências dos iniciadores, bem como as seqüências alvo destes iniciadores foram validadas por alinhamento em bancos de dados.

A busca por seqüências de proteínas tirosina-fosfatases do *T. cruzi* resultou em uma seqüência de aminoácidos da proteína tirosina-fosfatase localizada no cromossomo 3 do clone CL Brener (Figura 10). Uma vez que a seqüência de nucleotídeos não se encontrava disponível em bancos de dados, fizemos a conversão desta seqüência de aminoácidos em nucleotídeos. Posteriormente, identificamos o domínio catalítico dessa proteína e desenhamos iniciadores específicos para um fragmento de 116pb localizado dentro desse domínio (Figura 11). Estes iniciadores foram utilizados nos ensaios de RT-PCR e qPCR (Figuras 12 e 13). Nossos resultados não apontaram alterações na expressão do mRNA da TcPTP nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR de *T. cruzi* após o estímulo com IFN- γ . A expressão do mRNA da TcPTP também foi avaliada nas formas epimastigotas das populações BZS e BZR de *T. cruzi* através de qPCR (Figura 14). Os resultados mostraram que a expressão do mRNA da TcPTP na população BZS foi $2,46 \pm 0,48$ vezes maior do que na população BZR, mostrando que a redução de $1,3 \pm 0,1$ vezes na expressão do mRNA desta enzima, observada nas células infectadas com a população BZR, pode ser uma característica intrínseca da população BZR.

O fato da população BZS apresentar uma maior expressão da TcPTP do que a população BZR e a estimulação com rIFN- γ das células infectadas com essas populações

não causar alterações na expressão do mRNA desta proteína sugerem que a expressão do mRNA da TcPTP não esteja envolvida na desfosforilação de proteínas fosforiladas e conseqüentemente no mecanismo de escape do *T. cruzi* à ação antimicrobiana do IFN- γ em fibroblastos humanos.

A tabela 3 apresenta um resumo dos resultados de expressão do mRNA obtidos com a técnica de qPCR nos fibroblastos 2C4.

Tabela 3 – Resumo dos resultados da expressão do mRNA obtidos com a técnica qPCR nos fibroblastos humanos 2C4.

	IDO	IRF-1	IRF-2	TcPTP
2C4	ND	—	—	ND
2C4 + IFN-γ (controle)	↑	↑	↑	ND
2C4 + BZS	ND	—	—	—
2C4 + BZS + IFN-γ	↓	—	—	—
2C4 + BZR	ND	—	—	—
2C4 + BZR + IFN-γ	↓	↓	↑	—

ND : Não detectado, —: não sofreu alteração, ↑: aumento da expressão, ↓: diminuição da expressão em relação ao controle (2C4 + IFN- γ)

Em síntese, nossos resultados mostram que os parasitos resistentes causaram simultaneamente uma diminuição na expressão do mRNA da IDO, do IRF-1 e um aumento na expressão do mRNA do IRF-2 nos fibroblastos humanos infectados e estimulados com rINF- γ . Estes resultados sugerem que parasitos resistentes sejam capazes de interferir nos mecanismos celulares de expressão gênica ativados por IFN- γ e, por esta razão, possam apresentar um potencial evasivo maior para a resposta induzida por esta citocina comparado com os parasitos sensíveis. Isto implicaria em uma maior sobrevivência da população resistente aos mecanismos antimicrobicidas da célula hospedeira ativada pelo IFN γ . Estes dados corroboram com os dados de Michailowsky et al. (1998). Os autores mostraram que os níveis de IL-12 produzidos por macrófagos inflamatórios estimulados com IFN- γ foram significativamente menores nas células infectadas com as cepas naturalmente resistentes Colombiana e VL10 comparados com os macrófagos infectados com as cepas sensíveis Y, J, Gilmar e o clone CL Brener. Uma vez que a IL-12 é um dos genes induzidos

por IFN- γ , este achado sugere uma intervenção maior dos parasitos resistentes nos mecanismos celulares ativados pelo IFN- γ . Além disso, nossos resultados concordam com os dados publicados por Murta et al. (1999) que demonstraram que a síntese de IFN γ e óxido nítrico (NO) em esplenócitos murinos infectados com a população BZS de *T. cruzi* foi significativamente maior comparada à das células infectadas com a população BZR. Dessa forma, os resultados apresentados neste estudo reforçam a hipótese de que parasitos sensíveis a drogas são melhores estimuladores da resposta imune do hospedeiro mediada por IFN γ e conseqüentemente mais susceptíveis aos mecanismos antimicrobianos ativados por esta citocina.

*Resumo dos Resultados
e Conclusão*

Resumo dos resultados

- Após 8 passagens em cultura de fibroblastos humanos sem a pressão da droga, a população BZR foi duas vezes mais resistente ao BZ comparado com o seu par sensível.
- O estímulo dos fibroblastos 2C4 com rIFN- γ aumentou a expressão do mRNA daIDO e dos fatores IRF-1 e IRF-2.
- Os parasitos resistentes causaram uma diminuição na expressão do mRNA daIDO, do IRF-1 e um aumento na expressão do mRNA do IRF-2 nos fibroblastos humanos infectados e estimulados com rINF- γ .
- Os parasitos resistentes causaram uma diminuição na expressão do mRNA daIDO, mas não causaram alterações na expressão do IRF-1 e IRF-2 nos fibroblastos estimulados com rIFN- γ .
- A estimulação com rIFN- γ não causou alterações na expressão do mRNA da TcPTP nos fibroblastos infectados com as populações BZS ou BZR de *T. cruzi* sugerindo que a expressão do mRNA da TcPTP não esteja envolvida no mecanismo de escape do *T. cruzi* à resposta mediada pelo IFN- γ .
- A expressão do mRNA da TcPTP é duas vezes maior nas formas epimastigotas da população BZS do que da população BZR de *T. cruzi*.

Conclusão

Nossos resultados mostram que parasitos resistentes possuem um maior potencial evasivo à resposta mediada pelo rIFN- γ comparado com os parasitos sensíveis, sugerindo uma correlação do fenótipo de resistência de *T. cruzi* a drogas com o mecanismo de escape do parasito à ação antimicrobiana induzida por esta citocina.

Considerações Finais

Considerações finais

Os resultados apresentados nessa dissertação identificam diferenças na expressão gênica de células infectadas pelo *T. cruzi* e estimuladas pelo IFN- γ *in vitro*. Ressaltamos que cuidados adicionais devem ser tomados ao se tentar extrapolar as interpretações desses resultados para o sistema *in vivo*.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Adams O, Besken K, Oberdorfer C, MacKenzie CR, Russing D, Daubener W 2004. Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 6:806-812.
- Aguet M, Dembic Z, Merlin G 1988. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell.* 55:273-280.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P 2002. *Molecular Biology of the Cell.* 4th.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull. World Health Organ.* 63:721-726.
- Aria K, Frank L, Atsushi M, Shoichino M, Naoko A, Takachi Y 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory response. *Annu. Rev. Biochem.* 59:783-836
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15:563-591.
- Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Cansado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZMP, Moreira MC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R 2000. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J. Infect. Dis.* 182:634-638.
- Balaraman S, Tewary P, Singh VK, Madhubala R 2004. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317:639-647.
- Blanco JC, Contursi C, Salkowski CA, DeWitt DL, Ozato K, Vogel SN 2000. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon gamma-dependent cyclooxygenase 2 expression. *J. Exp. Med.* 191:2131-2144.
- Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S 1999. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol.* 162:957-964.
- Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu. Rev. Immunol.* 15:749-795.
- Bonjardim CA 1998. JAK/STAT-deficient cell lines. *Braz.J Med Biol Res.* 31:1389-1395.
- Buates S and Matlashewski G 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J. Immunol.* 166:3416-3422.
- Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ 1986. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect. Immun.* 53:347-351.
- Ceravolo IP, Chaves AC, Bonjardim CA, Sibley D, Romanha AJ, Gazzinelli RT 1999. Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway. *Infect Immun.* 67:2233-2240.
- Chaves Acl, Ceravolo IP, Gazzinelli RT, Romanha A.J 1998. Tryptophan degradation in human fibroblasts induced by interferon-gama is partially inhibited by *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 93:146-146.

- Chaves ACL, Franklin BS, Cerávolo IP, Gazzinelli RT, Romanha AJ 2001. Interferon regulatory factor (IRF-2) may be involved in the inhibition of IFN- γ -induced tryptophan degradation by *Trypanosoma cruzi* in human fibroblasts. In: XXVI MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34:144-144.
- Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL 1996. Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J. Biol. Chem.* 271:17247-17252.
- Cooper AM and Flynn JL 1995. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Immunol.* 7:512-516.
- Daubener W and MacKenzie CR 1999. IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 467:517-524.
- Denis M 1994. Human monocytes/macrophages: NO or NO? *J. Leukoc. Biol.*, 55, 682.
- De Avalos SV, Blader IJ, Fisher M, Boothroyd JC, Burleigh BA 2002. Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription. *J. Biol. Chem.* 277:639-644.
- Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:15623-15628.
- Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ 1992. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol.* 149:3008-3015.
- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem, Inst, Oswaldo Cruz.* 97:603-312.
- Dvorak JA and Howe CL 1977. The effects of lampit (Bayer 2502) on the interaction of *Trypanosoma cruzi* with vertebrate cells in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26:58-63.
- Feng GS and Taylor MW 1989. Interferon gamma-resistant mutants are defective in the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7144-7148.
- Filardi LS and Brener Z 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:755-759.
- Fujita T, Reis LF, Watanabe N, Kimura Y, Taniguchi T, Vilcek J 1989. Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:9936-9940.
- Fukao T, Matsuda S, Koyasu S 2000. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol.* 164:64-71.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.* 22:2501-2506.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 153:2533-2543.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6:995-1001.

- Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell*. 58:729-739.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 6:986-994.
- Heinzel FP, Ahmed F, Hujer AM, Rerko RM 1996. Immunoregulation of murine leishmaniasis by interleukin-12. *Res.Immunol*. 146:575-581.
- Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*. 260:547-549.
- Ichikawa JK, Norris A, Bangera MG, Geiss GK, 't Wout AB, Bumgarner RE, Lory S 2000. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proc.Natl.Acad Sci U.S A*. 97:9659-9664.
- Jankovic D, Sher A, Yap G 2001. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr. Opin. Immunol*. 13:403-409.
- Johnson HM, Bazer FW, Szente BE, Jarpe MA 1994. How interferons fight disease. *Sci Am*. 270:68-75.
- Kierszenbaum F 1995. What are T-cell subpopulations really doing in Chagas disease? *Parasitol Today*. 11:6-7.
- Kimura T, Nakayama K, Penninger J, Kitagawa M, Harada H, Matsuyama T, Tanaka N, Kamijo R, Vilcek J, Mak TW, . 1994. Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science*. 264:1921-1924.
- Knutson KL, Hmama Z, Herrera-Velitz P, Rochford R, Reiner NE 1998. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1. *J Biol Chem*. 273:645-652.
- Kozlowski M, Larose L, Lee F, Le DM, Rottapel R, Siminovitch KA 1998. SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol*. 18:2089-2099.
- Langer JA and Pestka S 1988. Interferon receptors. *Immunol Today*. 9:393-400.
- MacKenzie CR, Hadding U, Daubener W 1998. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *J Infect Dis*. 178:875-878.
- MacKenzie CR, Gonzalez RG, Kniep E, Roch S, Daubener W 1999. Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. *Adv.Exp.Med Biol*. 467:533-539.
- Martin D and Tarleton R 2004. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Immunol Rev*. 201:304-317.
- Martin DL and Tarleton RL 2005. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol*. 174:1594-1601.
- Medzhitov R and Janeway C, Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 173:89-97.
- Michailowsky V, Murta SM, Carvalho-Oliveira L, Pereira ME, Ferreira LR, Brener Z, Romanha AJ, Gazzinelli RT 1998. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of benzimidazole during

- acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2549-2556.
- Muller LA, Anasco N, Gonzalez Cappa SM 1986. *Trypanosoma cruzi*: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. *Exp. Parasitol.* 61:284-293.
- Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp. Med.* 187:2103-2108.
- Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M 1992. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 33:35-40.
- Murray HW, Rubin BY, Carriero SM, Harris AM, Jaffee EA 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 134:1982-1988.
- Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem. Parasitol.* 93:203-214.
- Murta SM and Romanha AJ 1998. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology.* 116 (Pt 2):165-171.
- Murta SM, Ropert C, Alves RO, Gazzinelli RT, Romanha AJ 1999. In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunol.* 21:535-544.
- Nandan D and Reiner NE 1995. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect. Immun.* 63:4495-4500.
- Nandan D and Reiner NE 2005. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clin Immunol.* 114:266-277.
- Nathan CF and Hibbs JB, Jr. 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3:65-70.
- Neal RA and van Bueren J 1988. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:709-714.
- Nirde P, Larroque C, Barnabe C 1995. Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *C R Acad Sci III.* 318:1239-1244.
- Olivier M, Romero-Gallo BJ, Matte C, Blanchette J, Posner BI, Tremblay MJ, Fauree R 1998. Modulation of Interferon-gamma-induced Macrophage Activation by Phosphotyrosine Phosphatases Inhibition: effect on murine leishmaniasis progression*. *Cell Biology and Metabolism.* 273:13944-13949.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev.* 18:293-305.
- Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS 1987. The actions of interferon and antiinflammatory agents of induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144:1147-1153.

- Ozaki Y, Borden EC, Smalley RV, Brown RR 1991. Interferon type I and II antagonism: a novel regulatory mechanism of indoleamine dioxygenase induction in human peripheral blood monocytes and peritoneal macrophages. *Adv.Exp.Med Biol.* 294:547-553.
- Paguirigan AM, Byrne GI, Becht S, Carlin JM 1994. Cytokine-mediated indoleamine-2,3-dioxygenase induction in response to Chlamydia infection in human macrophage cultures. *Infect. Immun.* 62:1131-1145.
- Paludan SR 1998. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol.* 48:459-468.
- Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ 2000. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem.* 275:6764-6769.
- Ptashne M, Gann A 2002. Genes and signals. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Pfefferkorn ER 1984. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc.Natl.Acad Sci U.S A.* 81:908-912.
- Ray M, Gam AA, Boykins RA, Kenney RT 2000. Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *J.Infect.Dis.* 181:1121-1128.
- Reed SG 1988. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* 140:4342-4347.
- Romagnani S 1992. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today.* 13:379-381.
- Romanha AJ, Alves RO, Murta SM, Silva JS, Ropert C, Gazzinelli RT 2002. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis.* 186:823-828.
- Schofield L, Ferreira A, Altszuler R, Nussenzweig V, Nussenzweig RS 1987. Interferon-gamma inhibits the intrahepatocytic development of malaria parasites in vitro. *J Immunol.* 139:2020-2025.
- Scott VR and Matthews TR 1987. The efficacy of an N-substituted imidazole, RS-49676, against a *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Am J Trop Med Hyg.* 37:308-313.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp.Med.* 175:169-174.
- Silva LHP and V.Nussenzweig 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Fol.Clin.Biol.* 20:191-208.
- Sims SH, Cha Y, Romine MF, Gao PQ, Gottlieb K, Deisseroth AB 1993. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol Cell Biol.* 13:690-702.
- Staeheli P 1990. Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv.Virus Res.* 38:147-200.
- Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev.Microbiol.* 28:187-248.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD 1998. How cells respond to interferons. *Annu.Rev Biochem.* 67:227-264.

- Tan RS, Feng C, Asano Y, Kara AU 1999. Altered immune response of interferon regulatory factor 1-deficient mice against *Plasmodium berghei* blood-stage malaria infection. *Infect Immun.* 67:2277-2283.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu.Rev Immunol.* 19:623-655.
- Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science.* 285:107-110.
- Taylor MW and Feng GS 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 5:2516-2522.
- Teixeira JE and Mann BJ 2002. Entamoeba histolytica-induced dephosphorylation in host cells. *Infect.Immun.* 70:1816-1823.
- Thomas SM, Garrity LF, Brandt CR, Schobert CS, Feng GS, Taylor MW, Carlin JM, Byrne GI 1993. IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma* growth. *J Immunol.* 150:5529-5534.
- Torrice F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* 146:3626-3632.
- Urbina JA 1999. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J Mol Med.* 77:332-338.
- Urbina JA and Docampo R 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* 19:495-501.
- Veronesi R, Focaccia R 2004. Tratado de Infectologia, Atheneu, São Paulo, p.1268-1272.
- Wirth JJ, Kierszenbaum F, Sonnenfeld G, Zlotnik A 1985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 49:61-66.
- Wisseman CL, Jr. and Waddell A 1983. Interferonlike factors from antigen- and mitogen-stimulated human leukocytes with antirickettsial and cytolytic actions on *Rickettsia prowazekii*. Infected human endothelial cells, fibroblasts, and macrophages. *J Exp.Med.* 157:1780-1793.
- World Health Organization 2002. Control of Chagas Disease. 905:1-109.
- World Health Organization and (WHO) 2002. Chagas disease. Tropical disease research In: eighteen programme report of UDNPD/World bank/ WHO Special Programme for Research and Training in tropical disease research: progress 1995-1996. Geneva. 112-123.
- Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K 1998. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol.* 161:3400-3407.
- Yuan W, Collado-Hidalgo A, Yufit T, Taylor M, Varga J 1998. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J Cell Physiol.* 177:174-186.
- Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R 1998. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by *Trypanosoma cruzi* is linked to cell invasion. *FEMS Microbi ol.Lett.* 161:15-20.