

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

INIBIÇÃO DA MORTE POR APOPTOSE DE LINFÓCITOS T CD8 RESGATA CÉLULAS DA EXAUSTÃO E COM CAPACIDADE FUNCIONAL NO MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO PELO TRYPANOSOMA CRUZI

¹Thaís da Silva Rigoni (IC/UNIRIO); ²Mariela Pires Cabral Piccin; ²Natália de Santana Vellozo; ²George A. Dos Reis; ²Marcela F. Lopes; ¹Landi V. C. Guillermo (Orientadora).

1 - Departamento de Microbiologia e Imunologia; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

2 - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho; Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Apoio financeiro: IC/UNIRIO.

Palavras-chave: Doença de Chagas; apoptose; zVAD.

INTRODUÇÃO

O protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, é o agente etiológico da Doença de Chagas; doença transmitida através dos insetos triatomíneos (SALVATELLA, R. 2007; LAUER, B. et al. 1997). Estima-se que existam aproximadamente 12 milhões de portadores da doença crônica nas Américas, cerca de 2 a 3 milhões no Brasil (AGÊNCIA FIOCRUZ, 2013). Em 2005, as autoridades brasileiras – Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde – promoveram o Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, provendo diversas informações a respeito da doença, a fim de atenuar o índice de contágio. Apesar dessa iniciativa apresentar algum êxito no controle da transmissão vetorial, a falta de tratamento eficaz, ou mesmo a inexistência de uma vacina, impossibilitam a erradicação da doença, principalmente para aqueles com a forma crônica da mesma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A combinação da resposta imune inata e adaptativa, desempenhadas por macrófagos, células B (KUMAR, S. AND TARLETON, R. L. 1998), células T (TARLETON, R. L. et al. 1992; ROTTENBERG, M. E., et al 1993; ROTTENBERG, M. E., et al 1996), e citocinas tipo 1, controlam a parasitemia durante a infecção aguda, mas o *T. cruzi* permanece em tecidos do hospedeiro ao longo da vida (TARLETON, R. L., GRUSBY, M. J. AND ZHANG, L. 2000). Células T CD8 são cruciais para o controle da disseminação do *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda da infecção (PADILLA AM. et al 2009). A presença de células T CD8 tem sido demonstrada em análises histopatológicas da fase crônica da infecção. Células TCD8 ativadas têm a capacidade de produzir IFN- γ e de mediar citotoxicidade, e têm sido associadas tanto com o controle do parasita quanto com a lesão patológica. A descrição de populações de células T CD8 caracterizadas como inflamatórias (IFN- γ +) e citotóxicas (Perforina+) vem elucidando a dualidade funcional das células T CD8, implicando as células TCD8 citotóxicas na causa da cardiite enquanto que as células TCD8 inflamatórias como responsáveis pelo controle do parasita (SILVERIO JC. et al. 2010).

Além disso, células T sofrem morte por apoptose durante a infecção pelo *T. cruzi* (LOPES, M. F. et al. 1995), e a estimulação antigênica excessiva e prolongada de linfócitos T induz a expressão de receptor de Fas e de ligante de Fas (FasL) em linfócitos T tornando-as suscetíveis a sofrer apoptose via Fas-FasL (LOPES, M. F. et al. 1995; LOPES, M. F. et al. 1999). Células apoptóticas aumentam a replicação do parasita em macrófagos co-cultivados (FREIRE DE LIMA, C. G. et al. 2000; NUNES, M. P. et al. 1998) permitindo a persistência crônica do parasita. A apoptose de células imunes como os linfócitos T tem um impacto profundo na capacidade efetora dessas células, induzindo sua perda funcional gradualmente, diminuindo a habilidade proliferativa, produção de IL-2, e função citotóxica (WHERRY EJ. 2011; JIN HT. et al. 2011) – fenômeno de exaustão de células T (WHERRY EJ. 2011). Células T exauridas apresentam alta e sustentada expressão de moléculas inibitórias como o programa de morte-1 (PD-1), proteína-3 contendo um domínio de mucina (TIM-3) e gene-3 de linfócitos ativados (LAG-3) (WHERRY EJ. 2011). Tais evidências, in vivo, induzem ao questionamento se a inibição da apoptose pode modular a resposta imune durante a fase aguda da infecção com *T. cruzi*.

OBJETIVO

Caracterizar funcionalmente os linfócitos T CD8 após a inibição in vitro da apoptose, no modelo experimental da doença de Chagas.

METODOLOGIA

Todos os processos e experimentos com camundongos foram executados de acordo com as normas do Comitê de Ética institucional.

Infecção dos camundongos com *Trypanosoma cruzi* e manutenção do parasita.

A infecção foi feita com 2x10⁵ formas de tripomastigotas de *T. cruzi* (Dm28c) em camundongos BALB/c com 6 a 9 semanas. Para obter as formas tripomastigotas a metacicloogênese foi induzida quimicamente. Os camundongos utilizados nos experimentos se encontravam em fase aguda, com 19 a 22 dias após a infecção.

Obtenção de linfócitos esplênicos.

Baço de camundongos infectados pelo *T. cruzi* ou de camundongos normais foram coletados e macerados. Foi feita a lise das hemácias na solução de células obtida. As células esplênicas foram incubadas em colunas de lâ ou foram cultivadas. As células T enriquecidas em colunas de lâ e as células totais

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

do baço foram ressuspensas em DMEM suplementado (piruvato de sódio, aminoácidos não-essenciais, glutamina, β -mercaptoetanol) com 10% de SFB, contadas e plaqueadas (2×10^6 /poço/500 μ L). Foram cultivadas por 48h, somente com meio de cultura ou com anticorpos monoclonais anti-CD3 e com zVAD (peptídeo inibidor de caspases) ou DMSO (controle do diluente).

Inibição da apoptose.

Linfócitos T foram cultivados na presença ou ausência de anticorpos monoclonais anti-CD3, e tratados com zVAD ou DMSO, por 48h.

Citometria de Fluxo.

A expressão de fosfatidilserina para identificação de células apoptóticas foi realizada através do uso de anticorpos anti-Anexina V. Para identificação de células necróticas utilizou-se o 7AAD capaz de marcar células com membrana plasmática permeáveis. A caracterização funcional foi realizada através do uso de anticorpos monoclonais acopladas a fluorocromos anti-CD8, anti-Perforina, anti-Granzima B e anti-IFN γ . A exaustão celular foi analisada através da marcação do PD1, e a capacidade citotóxica por meio de anticorpos anti-CD107, marcador de degranulação.

RESULTADOS

Nossas análises, ex vivo, mostraram que animais infectados apresentam elevado número de células T exauridas (CD8+ PD1+) em comparação com o animal normal na fase aguda da infecção. Com o intuito de observar se o processo de ativação estaria levando à exaustão clonal, reestimulamos a cultura com anti-CD3 e também observamos aumento significativo do percentual de células T CD8 exauridas (PD1+). Esses dados corroboram com os achados da literatura que mostraram aumento de PD1 em linfócitos T na infecção com T. cruzi, in vivo e in vitro (FREDY R. S. et al. 2011).

Continuando nossa avaliação da capacidade funcional das células T durante a infecção, nós investigamos a citotoxicidade das células T CD8 através do marcador de degranulação CD107. Na avaliação, ex vivo, não observamos diferença na expressão de CD107, em células T CD8 entre os animais infectados e o normal. Entretanto, na cultura de linfócitos esplênicos de animais infectados, há uma elevada porcentagem de células T CD8 CD107+, após estímulo com anti-CD3 em comparação com as células cultivadas somente com meio.

Para investigar se a produção de células TCD8 CD107+ era consequente da morte celular, nós avaliamos a apoptose das células T CD8 esplênicas de animais infectados; e observamos o aumento células T CD8 apoptóticas Anexina V+. A reativação, in vitro, com anti-CD3 destes linfócitos aumenta o percentual de células em apoptose, através da marcação de caspase 3.

Buscando entender o papel da apoptose no perfil das células T efectoras, usamos o inibidor de caspases (zVAD) na cultura de células T de animais infectados. O uso do zVAD na cultura estimulada com anti-CD3 diminui a expressão de caspase 3 e os níveis de morte por apoptose se comparado ao controle (diluente DMSO) corroborando com os dados prévios do nosso grupo (SILVA EM. et al. 2007). O uso do zVAD diminui o percentual de células T CD8 PD-1+ em relação as células reativadas com anti-CD3 ou com o controle (DMSO). Estes dados estão de acordo com as evidências que a diminuição da expressão de PD1 em células T CD8 e APC aumenta a resistência à infecção observada através da diminuição da parasitemia (FREDY R. S. et al. 2011). Entretanto esse grupo mostrou que o bloqueio PD-1/PDL-1 aumenta a mortalidade dos animais infectados com T.cruzi (FREDY R. S. et al. 2011). SILVA EM. et al. (2007) mostraram diminuição da parasitemia em camundongos tratados com zVAD na fase aguda da infecção. Esses dados em conjunto indicam o papel relevante das células T CD8 quando resistentes à exaustão e à apoptose.

Sabe-se que linfócitos T CD8 quando ativados com anti-CD3 produzem altos níveis de IFN- γ , perforina e granzima (NUNES, M. P. et al. 1998; HENRIQUES-PONS A, 2002). Dessa forma, com o intuito de investigar a capacidade funcional de células T CD8 que são resgatadas da morte por apoptose, após inibição com zVAD, avaliamos a expressão de CD107, perforina, granzima B e IFN- γ por células T CD8. O uso do zVAD resultou no aumento da expressão de CD107 e no aumento percentual de células TCD8 IFN- γ +, TCD8 perforina+ e TCD8 granzima+ mostrando, portanto, células T CD8 com diferentes capacidades funcionais. SILVERIO JC. et al. (2010) mostraram que células T CD8 perforina+ causam lesão no tecido cardíaco em camundongos infectados enquanto que células TCD8 IFN- γ + não são implicadas na lesão cardíaca.

CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que a capacidade de linfócitos T CD8 produzirem IFN- γ e efetuar citotoxicidade via granzima B e perforina são afetadas pela persistência do parasita e excesso de reativação, gerando células exaustas e que morrem por apoptose. A inibição da apoptose dos linfócitos T CD8 pelo zVAD aumenta a capacidade efetora via produção de IFN- γ e citotoxicidade via granzima B e perforina; resgatando as células T CD8 da exaustão. Portanto nossos dados sugerem que a inibição da apoptose promove a sobrevivência e recuperação da capacidade efetora das células T CD8 na infecção pelo T. cruzi.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acesso em: 06 maio 2014.
- ALIBERT, J. C. S.; CARDOSO, M. A. A. G.; MARINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. Infect Immun. 64:1961-1967, 1996.
- HENRIQUES-PONS A, OLIVEIRA GM, PAIVA MM, CORREA AF, BATISTA MM, BISAGGIO RC, LIU CC, COTTA-DE-ALMEIDA V, COUTINHO CM, PERSECHINI PM, ARAUJO-JORGE TC. Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in Trypanosoma cruzi infection. Int J Exp Pathol. 83(2):67-79, 2002.
- FREDY R. S. GUTIERREZ, FLÁVIA S. MARIANO, CARLO J. F. OLIVEIRA, WANDER R. PAVANELLI, PAULO M. M. GUEDES, GRACE K. SILVA, ANA P. CAMPANELLI, CRISTIANE

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- M. MILANEZI, MIYUKI AZUMA, TASUKU HONJO, MAURO M. TEIXEIRA, JULIO C. S. ALIBERTI, E JOÃO S. SILVA. Regulation of Trypanosoma cruzi-Induced Myocarditis by Programmed Death Cell Receptor 1. *Infect Immun*. 79(5): 1873–1881, 2011.
- FREIRE DE LMA, C. G., NASCIMENTO, D. O., SOARES, M. B. P., BOZZA, P. T., CASTRO, FARIA NETO, H. C., DE MELLO, F. G., DOSREIS, G. A., LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403: 199–203, 2000.
- GEORGE, A. DOSREIS; FLAVIA L. RIBEIRO-GOMES; LANDI V.C. GUILLERMO.; MARCELA F. LOPES. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. *Science Direct*. 18: 97–105, 2007.
- JIN HT, JEONG YH, PARK HJ, HA SJ. Mechanism of Tcell exhaustion in a chronic enviroment. *BMB Rep*. 44: 217–231, 2011.
- JOHN S. YI, MAUREEN A. COX, ALLAN J. ZAJAC. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology*. 129:474–81, 2010.
- JOSKOWICZ, M. Susceptible mice present higher macrophages activation than resistant mice during infections with myotropic strains of Trypanosoma cruzi. *Parasite Immunol*, 11:385–395, 1989.
- LAUER B, NIEDERAU C, KUHLE U, SCHANNWELLI M, PAUSCHINGER M. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 30: 1354–1359, 1997.
- LOPES, M. F., DA VEIGA, V. F., SANTOS, A. R., FONSECA, M. E., DOSREIS, G. A. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J. Immunol*. 154: 744–752, 1995.
- NUNES, M. P., ANDRADE, R. M., LOPES, M. F., DOSREIS, G. A. Activation-induced T cell death exacerbates Trypanosoma cruzi replication in macrophages cocultured with CD4⁺ T lymphocytes from infected hosts. *J. Immunol*. 160: 1313–1319, 1998.
- PADILLA AM, BUSTAMANTE JM, TARLETON RL. CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection. *Curr Opin Immunol* 21: 385–390, 2009.
- PIPKIN, M.E; LIEBERMAN, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol*. 19: 301–308, 2007.
- REED, S.G. Cytokine control of the macrophages parasites Leishmania and Trypanosoma cruzi. *Molecular Approches to Parasitology*. New York: Wiley-Liss, Inc, pp 443–453, 1995.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MINOPRIO, P.; EISEN, H.; HONTEBEYRIE-SALVATELLA, R. Andean subregional Chagas disease area and the Andean initiative of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1: 39–40, 2007.
- SILVA EM, GUILLERMO LV, RIBEIRO-GOMES FL, DE MEIS J, NUNES MP, SENRA JF, SOARES MB, DOSREIS GA, LOPES MF. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to Trypanosoma cruzi infection. *Eur J Immunol*. 37:738–46, 2007.
- SILVERIO JC, DE-OLIVEIRA-PINTO LM, DA SILVA AA, DE OLIVEIRA GM, LANNES, VIEIRA J. Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in Trypanosoma cruzi infection. *Int J Exp Pathol*. 91: 72–86, 2010.
- WHERRY EJ. T cell exhaustion. *Nature Immunol*. 12: 492–499, 2011.
- ZHANG JY, ZHANG Z, JIN B, ZHANG SY, ZHOU CB, FU JL, WANG FS. Cutting edge: programmed death-1 up-regulation is involved in the attrition of cytomegalovirus-specific CD8+ T cells in acute self-limited hepatitis B virus infection. *J. Immunol*. 181: 3741–3744, 2008.