



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**Jorgete Logullo de Oliveira**

**ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS  
MURINOS CULTIVADOS SOBRE MATRIZ DE COLÁGENO I:  
FAVORECIMENTO DA REPLICAÇÃO DO *TRYPANOSOMA CRUZI***

**Rio de Janeiro**

**2014**



Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

## **JORGETE LOGULLO DE OLIVEIRA**

Alteração morfológica e funcional de macrófagos murinos cultivados sobre matriz de colágeno I: favorecimento da replicação do *Trypanosoma cruzi*

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

Orientador: Prof. Célio G. Freire de Lima

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Marise P. Nunes

Rio de Janeiro

2014

Oliveira, Jorgete Logullo

Alteração morfológica e funcional de macrófagos murinos cultivados sobre matriz de colágeno I: favorecimento da replicação do *Trypanosoma cruzi*.

UFRJ/IBCCF, 2014.

Tese (mestrado profissional) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-graduação em Formação Técnica para a Pesquisa Biomédica, 2014.

1. Alteração morfológica. 2. Macrófagos. 3. *Trypanosoma cruzi*

I.Freire-de-Lima, C.G.II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dedico este trabalho a Alessandra Filardy,  
pela amizade e por ter acreditado em mim.

Dedico também a todos os técnicos do IBCCF que sempre torceram pelo meu sucesso e em especial a dois amigos que já fizeram parte da minha vida e hoje não estão mais conosco- Ademilson Bezerra e Orlando Agrellos (*in memoriam*).

“Não desista enquanto você ainda for capaz de fazer um esforço  
a mais. É nesse algo a mais que está Sua vitória”

*Roberto Shinyashiki*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me abençoado dando forças para conseguir chegar até aqui, dando uma família e amigos maravilhosos.

À minha mãe *in memoriam*, pois ela foi a pessoa que sem dúvida contribuiu muito para a minha formação como pessoa.

A meu marido e companheiro Alcir por ter se policiado ao máximo para tentar compreender e respeitar este período tão importante na minha vida profissional.

Aos meus filhos Leonardo e Caio pelo carinho, respeito e principalmente paciência nos meus períodos de “surto”.

Ao meu orientador Célio Geraldo Freire de Lima por ter acreditado em mim, aceitando-me como aluna. Devo a ele meu título, pois além de orientador ele foi amigo, companheiro de trabalho, pois não somente me orientou como trabalhou junto comigo, este é um mérito só dele, uma pessoa que acima de tudo tem um espírito de parceria e com seu humor maravilhoso tornou esses dias leves devido suas brincadeiras e piadas diárias, mas ao mesmo tempo uma pessoa séria e dedicada. Foi muito bom trabalhar com você durante este período, obrigada por tudo...

À Marise P.Nunes por ter aceitado me co-orientar, sendo ela fundamental na minha formação, pois foi através dela que aprendi tudo que sei hoje. Devo a ela meu conhecimento prático e teórico e agradeço também pelo carinho, amizade e todos os mimos concedidos nos momentos em que eu estava para baixo.

Ao professor George dos Reis, por ter me aceito em seu laboratório e também pela oportunidade de dar mais um passo na minha carreira profissional, pelos ensinamentos e pelas críticas construtivas ao meu trabalho.

Ao Professor Fernando Costa e Silva Filho, pois foi através dele que esta tese pode ser realizada. A ideia desse trabalho nasceu após sua aula onde conversamos e ele com sua vasta experiência no assunto, acreditou que daria certo e abriu a porta de seu laboratório para que eu entrasse me dando todo suporte para a realização deste trabalho. O professor Fernando foi e é uma pessoa que acolhe seus alunos como um verdadeiro pai, sonha e vibra junto com cada um deles.

Ao meu irmão Professor Carlos Jorge Logullo de Oliveira por se colocar sempre à disposição para me ajudar e apoiar nesta empreitada e por ser para mim um exemplo de superação.

Ao professor Álvaro Leitão por ter implantado este curso de pós-graduação para nós técnicos dando-nos a oportunidade de realização de um sonho, ser mestre. Obrigada pela confiança e espero não ter te decepcionado.

As professoras Débora Decotè, Suzana Corte Real e Cristina Takiya pelo apoio científico e atenção dada durante a realização deste trabalho.

Ao Lindomar “*Lindinho*” pelo carinho, dedicação e incentivo, ele vibrou a cada vitória alcançada neste trabalho, ele me ajudou sempre dando força e se colocando à disposição. Um amigo!!!

À Juju, Natália, Carol, Isabel pelo carinho e paciência em me ensinar. Vocês foram verdadeiras professoras e amigas.

À Thelma e Camila do laboratório do professor Fernando, por estarem sempre prontas a me ajudar.

Aos Professores e amigos do laboratório de Biologia Imunitária, Kamila, Sâmara, Landi, Mariela, Angélica, Renata, Thais, Danielle, Alex, William, Roberta, pela paciência, compreensão e amizade.

As minhas amigas maravilhosas Joana, Beth e Rafinha, que são mais que amigas são irmãs, sempre ao meu lado, nos momentos de crise e de alegria dando força, carinho e colinho, amo vocês!!!!

Ao amigo Zezinho por cuidar dos meus animais e me ajudar em tudo que precisei.

A todos os Professores deste Instituto que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente realizar este trabalho.



## Resumo

Sabendo-se que a matriz extracelular (MEC) regula o comportamento das células, influenciando na proliferação, sobrevivência, morfologia, migração e diferenciação celular e sendo o colágeno I (COL I) um dos principais componentes da MEC. Inúmeras tentativas de cultivo celular utilizando esta proteína como arcabouço vêm sendo proposta. Esse arcabouço tem como finalidade manter as células em seu ambiente mais próximo do real (natural), *in vivo*.

Um dos fatores a ser modificado durante a produção de arcabouços para cultivo celular é a concentração do COL I, podendo esta variação ser responsável por modificações significativas na arquitetura e mecânica da matriz. Com o intuito de observarmos as alterações morfológicas em células de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c residentes submetidos ou não a infecção com *Trypanosoma cruzi*, escolhemos como modelo de arcabouço matriz de densidade de 1,5 mg/mL.

Avaliando o comportamento de células de macrófago peritoneais residentes infectadas ou não sobre matriz de COL I na concentração já mencionada anteriormente, observamos alterações na morfologia, proliferação, capacidade de internalização (migração) e carga parasitária após interação célula-matriz. Modificações na morfologia e carga parasitária em células cultivadas sobre a matriz foram significativamente diferentes quando comparadas a células cultivadas em superfície rígida (placa), sendo observada a morfologia mais alongada (mais espreitada) e a carga parasitária exacerbada e liberação precoce das formas tripomastigotas sanguíneas. Também foi constatado que células de macrófago cultivadas em superfície de matriz de densidade de 1,5mg/mL se internalizam mais rapidamente devido a frouxura da matriz.

Com isto podemos concluir que cultivo de células em matriz de COL I alteram a morfologia, proliferação, capacidade de internalização e liberação de carga parasitária quando comparadas com cultivos de células em superfície rígida (placa).

## Abstract

Knowing that the extracellular matrix (ECM) regulates cell behavior, influencing the proliferation, survival, morphology, cell migration and differentiation and being the type I collagen (COL I) a major component of the ECM. Numerous attempts to cell culture using this protein as a framework have been proposed. This framework aims to keep the cells in its nearest real (natural), in vivo environment. One of the factors to be modified during the production of scaffolds for cell culture is the concentration of COL I, this variation may be responsible for significant changes in the architecture and mechanics of matrix. In order to observe morphological changes in cells from peritoneal macrophages from BALB/c mice submitted or not to infection by *Trypanosoma cruzi*, we chose as a model framework matrix density of 1.5 mg/mL. Evaluating the behavior of cells infected or not on COL I matrix in peritoneal macrophage concentration residents already mentioned, we observed changes in morphology, proliferation, internalization (migration) and parasite load after cell-matrix interaction. Changes in morphology and parasite burden in cells grown on the matrix were significantly different when compared to cells cultured in hard surface (plate), a (more sprawling) more elongated morphology and excessive parasitic load and premature release of blood trypomastigotes was observed. It was also found that cells cultured in macrophage surface of the matrix density of 1.5 mg/ml are internalized more rapidly due to relaxation of the matrix. On this way we can conclude that cultivation of cells on COL I matrix alter their morphology, proliferation, internalization, and can release more parasites when compared to cultures of cells on hard surface (plate)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. – Doença de Chagas e <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2. – A Matriz Extracelular (MEC) Animal	7
1.2.1 – Definição, composição química e interações celulares	7
1.2.2 – Colágenos (COLs)	8
1.2.3 – Cultivo celular em ambientes 3D	9
1.2.4 – Modelos de MEC em 2D e 3D	10
1.2.5 – Matriz 3D constituída por COL I	13
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
4.1 – Animais	17
4.2 – Parasitos	17
4.3 – Obtenção de colágeno I	17
4.4 – Modelos de interação com colágeno I	18
4.5 – Obtenção de macrófagos e avaliação de carga parasitária <i>in vitro</i>	20
4.6 – Obtenção de células B1	21
4.7 – Cytospin	21
4.8 – Dosagem de citocinas por ELISA	21
4.9 – Dosagens de prostanóides por ELISA – Quantificação de mediadores Lipídicos por Ensaio Imuno-Enzimático (EIA)	22
4.10 – Microscopia Confocal	23
4.11 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24
4.12 – Análises Estatísticas	25
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>53</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

## **Lista de abreviaturas**

MEC – Matriz extracelular  
COL I – Colágeno fibrilar tipo I  
GAGs – Glicosaminoglicanas  
PTGs – Proteoglicanas  
FNs – Fibronectinas  
LMNs – Lamininas  
CD49a – Integrina alfa 1  
CD49b – Integrina alfa 2  
MAPK – Mapkinases  
VLA1 – Integrina alfa 1  
VLA2 – Integrina alfa 2  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent assay (Ensaio Imunoenzimático)  
CECAL – Centro de criação de animais de laboratório  
BHI – Brain Heart Infusion (Infusão de coração e cérebro)  
SFB – Soro fetal bovino  
TAU-P – Triatomine Artificial Urine- proline  
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium  
HBSS – Solução Salina de Hank's  
TNF $\alpha$  – Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ )  
IL-10 e IL-12 – Interleucina 10,12  
TGF $\beta$  – Transforming Growth Factor $\beta$  (Fator de Crescimento Transformante- $\beta$ )  
HCl – Ácido Clorídrico  
ON – Over night  
PBS – Solução tamponada com fosfatos  
PBS-T – Solução tamponada com fosfatos e tween  
BSA – Albumina bovina  
NO – Óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitrito  
TA – Temperatura ambiente  
FESEM – Microscópio de varredura de emissão de campo  
LPS – Lipopolissacarídeo  
IFN $\gamma$  – Interferon  $\gamma$

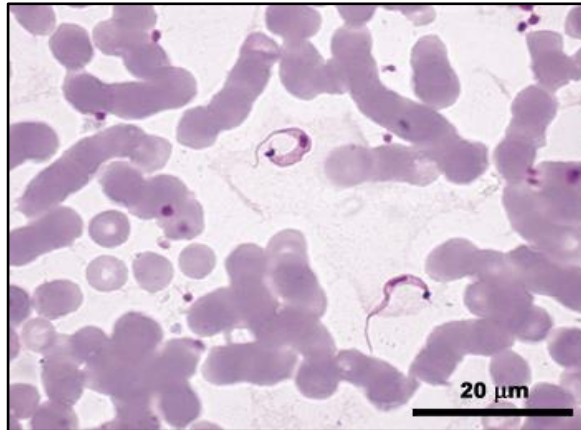
# 1. INTRODUÇÃO

## **1.1-Doenças de Chagas e o *Trypanosoma cruzi***

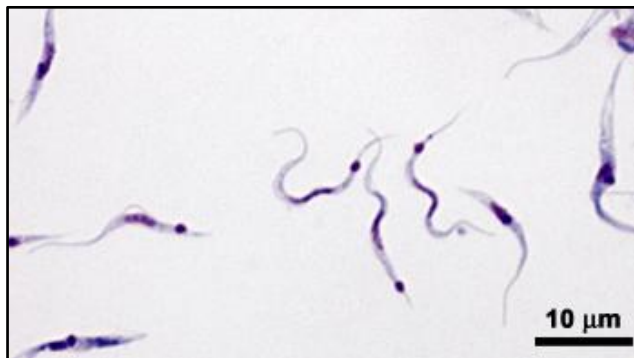
A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Essa doença foi descoberta por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909 e representou um marco importante na história da ciência já que ele descreveu não só as manifestações clínicas, mas também o agente etiológico, seu ciclo evolutivo, o inseto vetor e a epidemiologia da doença (Chagas, C. Nova tripanosomíase humana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1:159-218).

Os vetores são insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae, comumente conhecidos como “barbeiros”. Os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* são os mais importantes na transmissão da doença (Moncayo, 1997; Who, 2002).

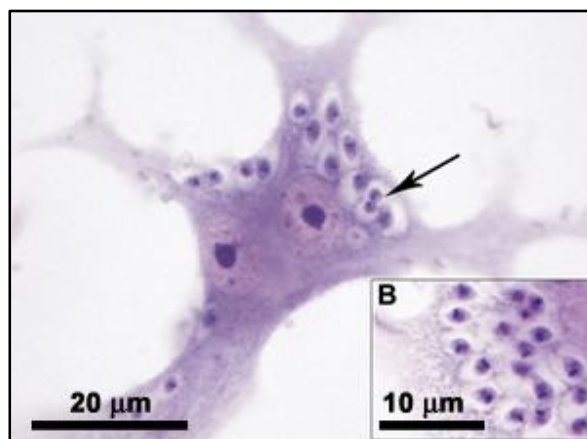
O *Trypanosoma cruzi* apresenta-se com aspectos morfológicos diferentes, quando se encontra no hospedeiro vertebrado ou nos transmissores. No inseto vetor são encontradas as formas epimastigotas (estágio replicativo) e tripomastigota metacíclica (estágio infectante). Em mamíferos encontramos as formas amastigotas (estágio replicativo) e tripomastigotas sanguíneos (forma infectante) (de Souza, 2002) (figuras 1, 2 e 3).



**Figura 1:** formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* retirado do site [www.fiocruz.br/chagas/](http://www.fiocruz.br/chagas/)



**Figura 2:** formas tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese *in vitro*) retirado do site [www.fiocruz.br/chagas/](http://www.fiocruz.br/chagas/)

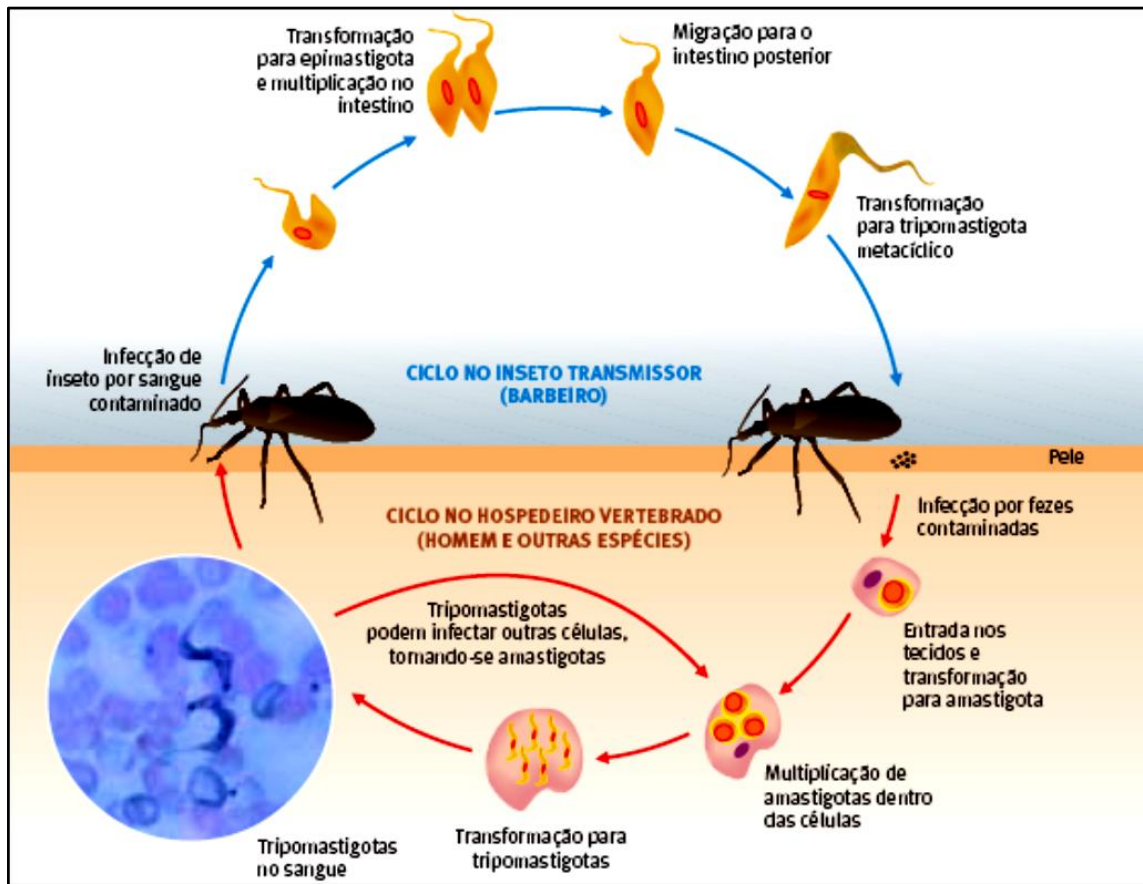


**Figura 3:** Formas amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* retirado do site [www.fiocruz.br/chagas/](http://www.fiocruz.br/chagas/)

A infecção ocorre quando as tripomastigotas metacíclicas invadem a corrente sanguínea e vão se disseminar para múltiplos órgãos e tecidos. Após infectar macrófagos, músculo ou outros tipos celulares, as tripomastigotas escapam rapidamente do vacúolo parasitóforo para o citoplasma, transformando-se em amastigotas. Após 5-6 dias as amastigotas transformam-se em tripomastigotas infectivos e a célula hospedeira se rompe, liberando assim, um grande número de parasitas nos espaços intersticiais (Morris *et al.*, 1990). Quando o inseto pica novamente o hospedeiro vertebrado, ingerem as formas tripomastigotas, estas se transformam em epimastigotas no estômago do inseto, migram para o intestino posterior do triatomíneo onde se transformam em tripomastigotas metacíclicas com capacidade infectiva. O ciclo de vida do parasita se fecha quando o inseto pica novamente outro hospedeiro vertebrado transmitindo as formas tripomastigotas através de suas fezes.

Existem outros mecanismos que contribuem para a disseminação da doença, além da transmissão natural (vetor/hospedeiro). Novos casos surgem especialmente através de transfusão sanguínea (Steindel, Dias & Romanha, 2005), via oral (ingestão de alimentos contaminados) (Nobuko Yoshida, 2008), transplante de órgãos e transmissão vertical (mãe infecta filho durante a gestação) (Dias e Schofield, 1998).

A transformação de epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas que acontece no intestino posterior do inseto triatomíneo pode ser mimetizada *in vitro* de acordo com o método descrito por (Contreras e colaboradores, 1985). Eles são capazes de infectar camundongos tão eficientemente quanto aos parasitos obtidos naturalmente da excreção de triatomíneos infectados (Contreras *et al.*, 1985; Lopes *et al.*, 1995).



**Figura 4:** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (ciclo doméstico). Ciência Hoje 37(217): 32, 2005

O *T. cruzi* pode infectar diversos tipos celulares do hospedeiro vertebrado independentemente de sua capacidade fagocítica. Inicialmente a entrada do *T. cruzi* na célula acontece através da formação do vacúolo parasitóforo. A interação desse vacúolo com endossomas e lisossomas da célula do hospedeiro origina o fagolisossoma. Aproximadamente 2 horas depois, o parasito destrói a membrana do vacúolo e escapa para o citoplasma, onde se diferencia em amastigota e se multiplica por divisão binária podendo ocupar todo o citoplasma da célula. Esse processo de replicação é seguido de uma nova fase de diferenciação em formas tripomastigotas. Pelo excesso de parasitas essas formas rompem a célula hospedeira e infectam células vizinhas ou alcançam a circulação sanguínea e infectam novas células. Os mecanismos pelos quais o *T. cruzi* é reconhecido e interiorizado são complexos e podem ocorrer por no mínimo dois processos básicos: endocitose/fagocitose, no qual o parasito é interiorizado passivamente através da via endocítica clássica, ou por



um processo ativo no qual o parasito é o agente da invasão. Os estudos iniciais da interação parasito-célula foram realizados com macrófagos uma vez que essas células são uma das primeiras a serem infectadas durante a infecção *in vivo* (Romano *et al.*, 2012).

O macrófago é uma célula muito ativa na movimentação ameboide, com morfologia variável conforme seu estado funcional e sua localização, núcleo ovoide ou em forma de rim, com cromatina condensada (Gordon, 1999). Tem importante papel na remoção de restos de células, de elementos extracelulares que se formam nos processos involutivos fisiológicos e de material extracelular alterado. Influenciam a atividade celular e a homeostase em vários tecidos; são células apresentadoras de antígenos para o reconhecimento inicial e remoção de células senescentes e providenciam uma linha frontal de defesa contra antígenos invasores e células tumorais recém-formadas (Martin *et al.*, 2014). Além das moléculas envolvidas nos mecanismos microbicidas e citotóxicos, os macrófagos secretam uma série de citocinas regulatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (ILs). Essas citocinas podem exercer efeitos autócrinos ou parácrinos, controlando a proliferação, diferenciação e função efetora dos próprios macrófagos, linfócitos e outras células envolvidas na resposta imune. (Miguel A, 2001).

Os macrófagos interagem com outras células e com a matriz extracelular em diversas situações durante sua ontogenia e diferenciação, assim como em resposta a estímulos fisiológicos apropriados. Sua habilidade de interagir com moléculas da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina e fibronectina, é um fator determinante para o desenvolvimento de suas funções. Essa interação permite que as células possam aderir-se e espraiar-se sobre a matriz e acontece via receptores específicos presentes na membrana celular, entre os quais se destacam as integrinas (Jacob & Sudhakaran, 2001).

Para infectar a célula hospedeira e se multiplicar, moléculas na superfície do *T. cruzi* precisam reconhecer e se ligar a moléculas na matriz extracelular e/ou na superfície da célula hospedeira. Como o estágio tripomastigota (metacíclico de barbeiro, metacíclico derivado cultura de epimastigota, sanguíneo, ou derivado da infecção de cultura de células) é considerado a principal forma infectiva, e diferentes tipos de células do

hospedeiro são passíveis de sofrer a invasão, é razoável pensar que haja mecanismos moleculares distintos envolvidos em cada tipo de interação (<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=119>). Nesse sentido, citamos algumas moléculas presentes na membrana de tripomastigotas metacíclicas importantes no processo de interação: gp82, gp35/50 e gp90. Entre as moléculas presentes na membrana de tripomastigotas obtidas de cultura de células infectadas foram identificadas a gp85, glicoproteínas do tipo mucinas, *trans*-sialidase e cruzipaina. Já na membrana de tripomastigotas sanguíneas foram encontradas moléculas da superfamília da gp85/TS, *trans*-sialidase que se liga aos componentes da matriz extracelular (fibronectina/laminina) e mucina (revisto por Romano *et al.*, 2012).

Os macrófagos fazem parte do sistema imune inato, reconhecendo, fagocitando e destruindo muitos patógenos em potencial, incluindo bactérias, protozoários e fungos (Curvinel W de M, 2010). A fagocitose inicia-se com o espriamento, caracterizado pela alteração da forma e redistribuição das organelas citoplasmáticas. As alterações na forma da célula aumentam a área de contato da membrana plasmática do fagócito com o substrato. Durante a aderência ocorre a ativação de receptores de membrana para moléculas de adesão, ocasionando o rearranjo do citoesqueleto celular (Trends in Cell Biology)

A relação entre o *T. cruzi* e suas células hospedeiras é complexa: além de atuarem como células alvo para a multiplicação dos parasitas, os macrófagos atuam também como células efectoras na eliminação dos parasitas intracelulares, já que como células apresentadoras de antígeno, processam e apresentam antígenos parasitários para as células T, dando início a resposta imune adquirida.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm evidenciado que macrófagos desempenham papel importante na resposta imune contra o *T. cruzi*. (Camargo *et al.*, 1997). O aumento dos níveis de citocinas inibe a replicação do parasito em macrófagos e parece influenciar no resultado da infecção. O IFN- $\gamma$  é a principal citocina da resposta Th1, com notável capacidade de ativar macrófagos e inibir replicação intracelular do parasito e a sua produção se dá

logo após a adesão e invasão do parasito na célula hospedeira (Cardillo, 1996; Aliberti *et al.*, 2001). Outras citocinas como IL-4 (resposta Th2), TGF- $\beta$  e IL-10 possuem ação anti-inflamatória e são capazes de inibir a ativação dos macrófagos induzidos por IFN- $\gamma$ , inibindo tanto a liberação dos metabólicos tóxicos quanto a diferenciação de células Th1, caracterizando um parasitismo sustentado (Abrahamsohn, 1998; Brodskyn *et al.*, 2002).

## **1.2- A Matriz Extracelular (MEC) Animal**

### **1.2.1- Definição, composição química e interações celulares.**

A matriz extracelular é composta por proteínas e polissacarídeos que são secretados pelos diversos tipos celulares que compõem os tecidos. Os diferentes tecidos não se caracterizam apenas em relação aos tipos celulares constituintes, mas, também, pela composição química, estrutura e mecânica de suas MECs. Tais propriedades, por sua vez, modulam as diversas funções celulares. Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, células e suas respectivas MECs estão em constante comunicação, onde o reconhecimento do ambiente extracelular pelos receptores e co-receptores presentes nas superfícies das células desencadeiam modificações funcionais (Bissell & Barcellos-Holff, 1987; Schenk & Quaranta, 2003; Vogel *et al.*, 2001).

Desta forma, o monitoramento do ambiente extracelular criado por células pró e eucarióticas é essencial à sobrevivência das mesmas.

Três grupos de macromoléculas associam-se fisicamente para formar a matriz extracelular: proteínas estruturais fibrosas, como os colágenos e as elastinas, um grupo distinto de glicoproteínas adesivas, incluindo fibronectina e laminina e um gel formado de cadeias de polissacarídeos da classe glicosaminoglicanas (GAGs), que são em geral encontradas ligadas covalentemente a proteínas na forma de proteoglicanas (Frantz *et al.*, 2010).

Proteínas fibrosas são especialmente abundantes na MEC. Muitas destas, tão logo são secretadas se estruturam sob a forma de redes ou longas

fibrilas. A família dos COLs é a forma mais abundante encontrada na rede fibrilar dos tecidos animais (25% em mamíferos).

### **1.2.2- Colágenos (COLs)**

Os COLs são proteínas fibrosas de ocorrência predominante no ambiente extracelular e estão envolvidos não apenas na estrutura supramolecular da MEC, mas, também, na modulação de diversos processos biológicos como adesão, migração, crescimento, diferenciação e reparo tecidual.

As fibras de colágeno reforçam e ajudam a organizar a matriz. Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas altamente características, encontradas em todos os animais multicelulares. Como componente principal da pele e dos ossos, eles são as proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo 30% da sua massa protéica total. A característica principal de uma molécula de colágeno típica é sua estrutura longa, rígida, de fita helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias  $\alpha$ , são enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda supertorcida. A conformação helicoidal em cadeia  $\alpha$  é estabilizada pela prolina, devido a sua estrutura em anel, enquanto a glicina é espaçada regularmente a cada dois aminoácidos por toda a região central da cadeia  $\alpha$  (Lee *et al.*,1999).

De acordo com sua estrutura e função, o colágeno pode ser classificado em grupos: colágenos que formam fibrilas, colágenos associados a fibrilas, colágenos que formam rede e colágenos de ancoragem. Pertencem ao grupo de colágenos que formam fibrilas os tipos I, II, III, V e XI, sendo que o colágeno tipo I é o mais abundante do corpo humano, onde ocorre como estruturas denominadas fibras colágenas, presentes nos ossos, dentina, tendões, cápsulas de diversos órgãos, derme, etc. As moléculas dos colágenos associados a fibrilas ligam as fibrilas colágenas umas às outras e também a outros componentes da matriz extracelular; compõem este grupo os colágenos tipos IX e XII. O colágeno cujas moléculas se associam para formar um feltro ou rede tridimensional é o tipo IV, um dos principais componentes das lâminas basais, que tem papel de aderência e filtração. O colágeno de ancoragem é do

tipo VII, que está presente nas fibrilas de ancoragem, que prendem as fibras colágenas às lâminas basais (Hay, 1981). Os principais aminoácidos encontrados nos colágenos são glicina (33,5%), prolina (12%), e hidroxiprolina (10%).

Nos colágeno tipo I, II e III, as moléculas de tropocolágeno se agregam em unidades microfibrilares que se juntam para formar fibrilas. Estas unidades fibrilares são reforçadas por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações covalentes. As fibrilas colágenas são estruturas delgadas e alongadas, com diâmetro variável, geralmente entre 20 e 90 nm, com uma estriação transversal característica, determinada pela sobreposição das moléculas de tropocolágeno. Nos colágeno tipo I e III, as fibrilas formam fibras e no tipo I, as fibras podem formar feixes (Minor, 1988).

Devido à vasta ocorrência de COLs no ambiente extracelular. O remodelamento de matrizes ricas em COL, que ocorre tanto em processos normais quanto patológicos, gera diversos fragmentos de cadeias de COL as quais induzem as MECs à apresentação de diferentes estruturas, químicas e supramoleculares (Ortega & Werb, 2002; Grant & Kalluri, 2005). Em decorrência, a dinâmica do diálogo molecular células-MEC implica no reconhecimento, por parte das células, de moléculas e seus fragmentos sob diferentes configurações. Assim, gera-se grande espectro de proteínas e mecanismos que as células possuem para reconhecer os diversos tipos de COL e seus fragmentos (Leitinger and hohenster, 2007).

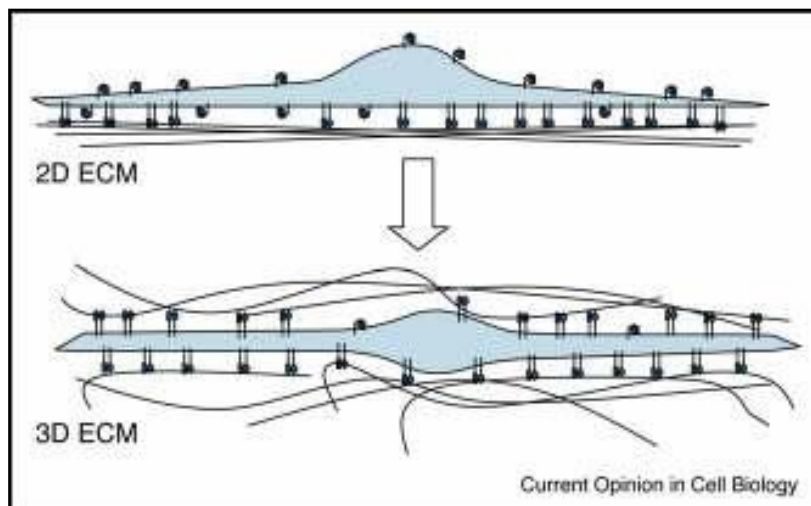
### **1.2.3- Cultivo celular em ambientes 3D**

Os materiais utilizados para o cultivo de células de mamíferos são constituídos de substratos rígidos e planares, feitos de vidro ou de plásticos submetidos a tratamentos especiais. Nas últimas décadas, contudo, observa-se na literatura científica um interesse crescente pelo cultivo de células de mamíferos, em particular as humanas, em ambientes arcabouços tridimensionais (3D). Isto é, o cultivo celular com o uso de substratos rígidos ou flexíveis/flutuantes estruturados em arcabouços 3D. Esta tendência se deve

principalmente ao fato deste tipo de cultivo proporcionar um ambiente mecanoquímico mais próximo àquele observado *in vivo*.

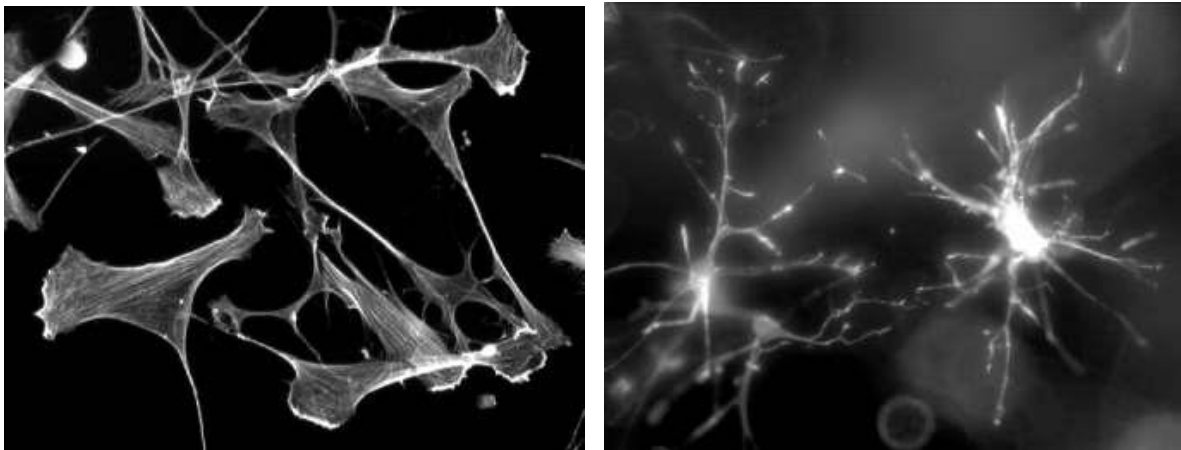
#### 1.2.4- Modelos de MEC em 2D e 3D

Moléculas de MEC, isoladas ou não, são mais propícias ao reconhecimento celular *in vitro* quando se encontram immobilizadas sobre um substrato (vidro, polímeros, cerâmico ou metais). Se devidamente immobilizadas (Silva-Filho & Menezes, 2004; Freire & Coelho-Sampaio, 2000), tais moléculas assumem configurações ativas e seus sítios de reconhecimento celular mantêm-se expostos. Quase a totalidade dos dados existentes sobre interações células-MEC foi obtida utilizando-se matrizes em duas dimensões (2D); com componentes de MEC adsorvidos ou immobilizados em substratos inertes. Para tais tipos de desenhos experimentais requer-se pouca quantidade ou baixa concentração de ligantes. No entanto, nesta condição, somente uma das faces da célula se encontra em contato com o ligante (Figura 5), o que é geometricamente diferente do que ocorre *in vivo*, onde a célula se encontra embebida na MEC.



**Figura 5:** Modelo esquemático sobre a disposição de moléculas de MEC em ambientes 2D e 3D, segundo Larsen et al., 2006.

Portanto, o uso de matrizes tridimensionais (3D) é uma ferramenta interessante e importante para se investigar as respostas celulares a macromoléculas de MEC *in vitro* e relacionar tais respostas ao que aconteceria *in vivo* (Grinnell, 2003). Células cultivadas em matrizes 3D experimentam, de fato, um ambiente mais rico química e geometricamente daquele apresentado por equivalentes em 2D (Figura 5). Devido a tal diferença geométrica, as respostas celulares podem, também, ser diferentes: em matrizes 3D a migração celular, por exemplo, é completamente distinta daquela apresentada por um mesmo eucarioto (protozoário e célula de mamífero) em 2D. Em 3D, células de mamíferos ativam vias de sinalização não observadas em 2D (Ingber, 2005). A morfologia de fibroblastos, por exemplo, resultante da interação da célula com o ambiente extracelular é completamente diferente em modelos 2D e 3D (Figura 6).



**Figura 6:** Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal (reatividade de actina à faloidina) de fibroblastos cultivados em redes de COL I constituídas em 2D (A) e 3D (B) (retirado de Grinnell, 2003).

Células de mamíferos respondem, de fato, à mecanoquímica do ambiente em que se encontram via reestruturação constante tanto dos seus esqueletos quanto do ambiente, ao que parece na busca da forma mais adequada termodinamicamente ou ergonômica. Tal fenômeno conhecido por tensegridade (Ingber, 1998) mostra a capacidade de células eucarióticas de responderem a ambientes estruturados em 2D e 3D. Características físicas do ambiente como tribologia (topografia + textura) e mecanoquímica podem determinar entrada em mitose (Folkman & Moscona, 1978) e a diferenciação

de células mesenquimais (Engler et al., 2006), ambas decorrentes de mecanotransdução (Ingber, 2006; Orr et al., 2006). O mecanismo de mecanotransdução mais estudado é aquele decorrente da resposta celular à rigidez do substrato (Eastwood et al., 1998; Rhee & Grinnell, 2007). A mecanotransdução não é, obviamente, o único fenômeno a influenciar o comportamento celular em 2D e 3D, mas é, possivelmente, aquele preponderante. Desta forma, os modelos de cultivo celular em 3D apresentam os atributos necessários para estudos sobre mecanotransdução.

No caso de cultivos celulares em superfícies 2D (plásticos ou vidros) os substratos são rígidos; isto é, não podem ser moldados por forças impostas pelas células. Conseqüentemente, a célula buscará adequar sua forma à geometria da MEC secretada e posteriormente adsorvida ao substrato plano. É fundamental frisar que o espalhamento celular é importante para a sobrevivência da célula, posto que do contrário ela torna-se susceptível a apoptose (Chen et al., 1997).

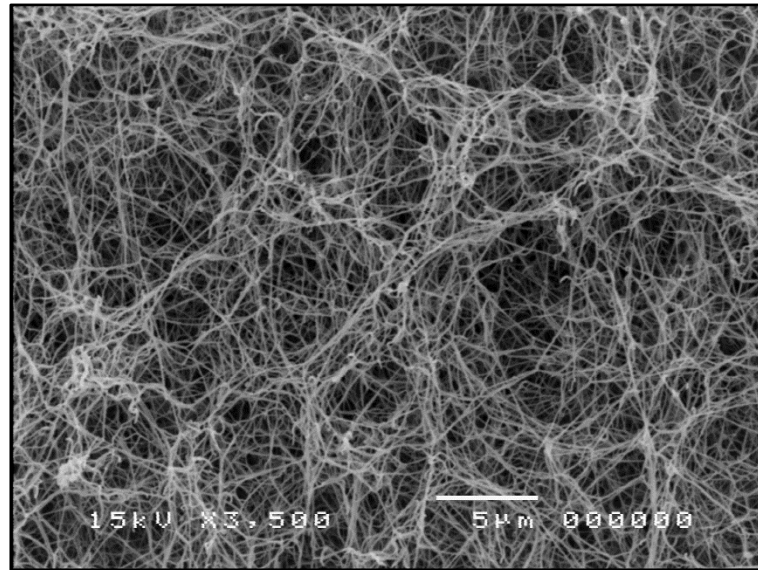
Diversos estudos demonstraram como a rigidez da MEC influencia na fisiologia celular. A taxa que diversos tipos celulares apresentam por substratos mais rígidos é um exemplo emblemático da capacidade das células de reconhecerem e se adaptarem a diferentes níveis de rigidez de seus substratos. Modelos *in vitro* de matrizes 3D podem mimetizar a densidade destes tipos de microambientes, de maneira a se adequarem a ensaios de interação células-MEC 3D (Stoitzner *et al.*, 2002).

A rigidez do substrato é fator preponderante nas diferentes expressões do fenótipo celular observado em cultivos 2D e 3D, mas não é o único. O estudo em matrizes 3D se faz importante tanto no aspecto físico quanto no aspecto químico relacionado à exposição de domínios de ligação presentes nas moléculas da MEC. Desta forma, a organização supra-estrutural apresentada por moléculas de MEC em 2D ou 3D resulta em substratos de adesão celular quimicamente distintos (Cukierman *et al.*, 2001).



### 1.2.5- Matriz 3D constituída por COL I

Como COL I é o tipo de colágeno mais abundante dos tecidos de mamíferos e, portanto, o de mais fácil obtenção em grande quantidade. MECs constituídas por COL I e estruturadas em 3D (Figura 7) são os modelos mais estudados, tanto no que diz respeito à mecânica apresentada por COL I quanto a sua interação com células eucarióticas.



**Figura 7:** Eletromicrografia por microscopia eletrônica de varredura de matriz de COL I (química) exibindo espessura (topografia) e porosidade (textura ou topologia) características (topografia + topologia = tribologia).

A dimensão dos poros e o diâmetro das fibras de COL I podem ser manipulados mediante alterações de pH e durante o processo de gelificação, apesar de alterações de pH serem limitadas quando se adicionam células à solução (Roeder *et al.*, 2002). Quando a solução de colágeno gelifica, seus monômeros condensam e se associam lateralmente formando fibras. Entretanto, a formação da matriz com característica de gel não ocorre via ligações covalentes entre as fibras, mas em decorrência do entrelaçamento destas (Guidry & Grinnell, 1985). O entrelaçamento por ligações covalentes pode ser realizado com o emprego de crosslinkers, principalmente glutaraldeído (Saito *et al.*, 2007; Weadock *et al.*, 1983). Entretanto, todos os crosslinkers utilizados até o momento revelaram-se citotóxicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hey *et al.*, 1990; Speer *et al.*, 1980), e o tempo de crosslinking por açúcares redutores pode demorar semanas (Girton *et al.*, 1999). Os géis de

COL I apesar de mecanicamente frágeis são biologicamente compatíveis, podendo, assim, ser utilizados como ambientes celulares *in vitro* para estudos de curto e longo prazo. Em matrizes de colágeno o diâmetro das fibras e o espaçamento entre elas depende da concentração de COL I assim como do pH e força iônica da solução a ser gelificada (Wood & Keech, 1960).

Os receptores de colágeno I presentes na superfície de macrófagos são conhecidos como integrina alfa 1 e integrina alfa 2 (CD49a e CD49b). As Integrinas constituem uma família de receptores de superfície celular que medeiam à adesão entre as células, ou entre uma célula e a matriz extracelular. Estas proteínas são heterodímeros compostos por duas subunidades diferentes, alfa e beta. Integrinas são expressas nas células hematopoiéticas, não hematopoiéticas e células tumorais. (Roberts *et al*, 1999).

A adesão célula/matriz é mediada e regulada pelas mudanças na afinidade do ligante com o agrupamento das integrinas. As integrinas alfa 1 e 2 formam um complexo com a subunidade beta comum 1 para formar as integrinas alpha1beta1 e alpha2beta1, que se liga a colágeno tipo I e laminina. Além disso, estudos sugerem que este complexo suprime a metástase no câncer e participa de co-estimulação das células T ativando as vias MAPK e PI3K. (Scott *et al*, 2008).

Matrizes extracelulares (ECMs) criam barreiras a migração celular. No entanto, os macrófagos são capazes de passar através de mais, se não todos, os tecidos do corpo. Para chegar a diferentes locais, a transmigração ocorre através da parede endotelial e é seguida pela migração através de membranas basais e nos tecidos intersticiais. Matrizes de membrana basal depositado sob epitélio e endotélio contêm principalmente colagénio IV e laminina, que formam redes poliméricas com elevada resistência. Matrizes estromais/intersticial formam a maioria do tecido conjuntivo do corpo e são compostas principalmente de colagénio fibrilar I reticulado em uma malha estável. A estrutura física de matrizes intersticiais é heterogénea que varia de regiões fibrilares soltas de tecido conjuntivo a denso compacto com espaçamento “submicron” (Ortega & Werb, 2002).

## 2. JUSTIFICATIVA

Embora o estudo de macrófagos em material de superfície rígida duas dimensões (2D), já tenha sido bem avaliado, os mecanismos envolvidos na interação macrófago/matriz (3D) ainda são pouco documentados.

É sabido que os macrófagos interagem com a matriz de colágeno I através dos receptores de superfície VLA-1 e VLA-2, e com base nos nossos resultados preliminares, acreditamos que essa interação não só favoreça a replicação de parasitas intracelulares, mas também aumente a secreção ou produção de mediadores lipídicos, possivelmente pela produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios. Sendo assim, pretendemos aprofundar os estudos da interação macrófago/matriz de colágeno e avaliar a participação desta interação na infecção *in vitro* pelo *T. cruzi*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral:**

Esta tese teve como objetivo central demonstrar a influência da matriz de colágeno I na replicação do *T.cruzi* em macrófagos murinos infectados *in vitro*.

#### **Objetivos específicos:**

Em particular, este estudo pretendeu abordar às seguintes questões:

- 1) Verificar se existe diferença morfológica de macrófagos murinos cultivados em diferentes superfícies;
- 2) Avaliar se existem diferenças na replicação do *T. cruzi* nas diferentes condições de cultivo dos macrófagos *in vitro*;
- 3) Verificar se a matriz de colágeno I exerce algum efeito na secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias, e de mediadores lipídicos;
- 4) Avaliar se existe migração de macrófagos cultivados sobre superfície revestida de colágeno I

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 - Animais**

Camundongos machos da linhagem BALB/c, com 6-8 semanas de idade foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL), Fiocruz/RJ, e mantidos em microisoladores, com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas para utilização de animais de laboratório estabelecida pela Comissão de Ética da UFRJ.

### **4.2 – Parasitos**

O clone Dm28c do *Trypanosoma cruzi* (Contreras *et al.*, 1988) foi utilizado em todas as experiências. As formas epimastigotas foram cultivadas, através de passagens sucessivas, em meio BHI (Difco/Becton & Dickinson Laboratories, Detroit, USA) suplementado com hemina (25 mg/L, Sigma Chemical Co.), ácido fólico (20 mg/L, Sigma Chemical Co.) e 10% de soro fetal bovino inativado a 56 °C (SFB, Gibco-Invitrogen), e mantidas em estufa BOD a 27 °C. As formas metacíclicas do clone Dm28c do *T. cruzi* foram diferenciadas *in vitro* em meio TAU-P “Triatomine Artificial Urine” (190mM NaCl; 8 mM de tampão fosfato de sódio, pH 6,0; 17 mM KCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,035% de NaHCO<sub>3</sub>, com adição de 10 mM de L-prolina; todos da Sigma Chemical Co.) segundo o protocolo descrito por Contreras *et al.* (1985).

### **4.3 - Obtenção de colágeno I**

O colágeno I (COL I) utilizado nos modelos 2D e 3D foi isolado de cauda de ratos Wistar através do seguinte processo: as caudas foram primeiramente lavadas com detergente e imersos em acetona por 5 minutos, tendo sido deixados em repouso em etanol até o dia da extração. Com ajuda de uma pinça e de uma tesoura cada vértebra da cauda foi quebrada para a retirada das fibras de colágeno (figura 8).



**Figura 8:** Extração de colágeno da cauda de rato Wistar

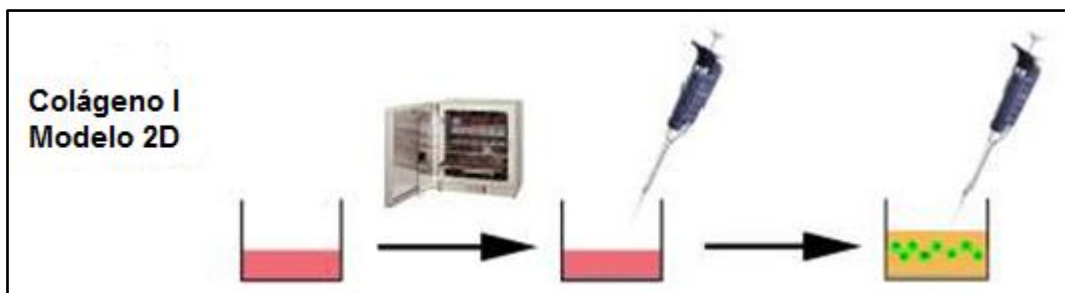
As fibras retiradas foram colocadas em solução de ácido acético 1% por 96h, a 4°C, para solubilização. Posteriormente, a solução foi submetida à ultracentrifugação a 30.000g, (BECKMAN COULTER, OPTIMA L-90) por 45 minutos, a 4°C, para o descarte das fibras não solubilizadas. O sobrenadante foi conservado e dialisado em clorofórmio 1% por 1 hora para esterilização da solução (Habermehl, 2005). Em seguida, a solução foi dialisada em ácido acético 0,02N estéril, por 3 dias, trocando-se a solução diariamente. Ao fim da diálise o produto foi conservado a 4°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método do peso seco (Habermehl, 2005).

#### ***4.4 - Modelos de interação com COL I***

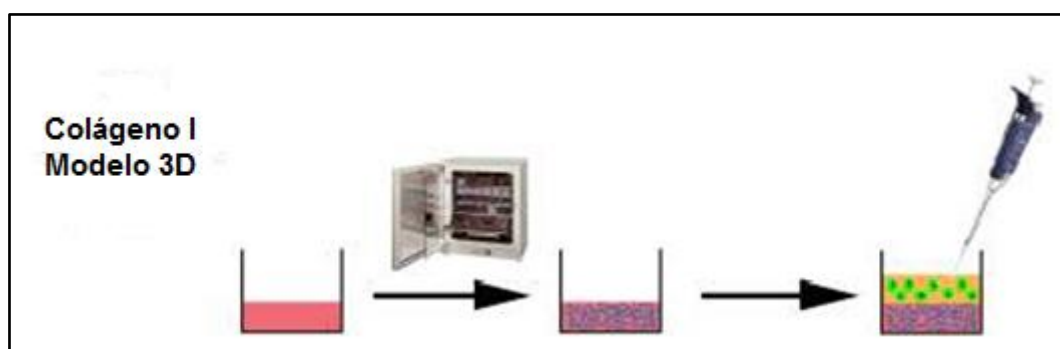
O modelo 2D (biofilme) de interação dos macrófagos com COL I foi obtido através do revestimento da superfície de placas de 24 poços com 300 µL da solução de COL I a 50µg/mL, em DMEM, que foram incubadas em estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida, o excesso da solução foi aspirada e 1mL da suspensão de macrófagos em meio DMEM completo foi adicionado aos poços ( $6 \times 10^5$  células/poço) (figura 9).

O modelo 3D foi obtido pela utilização de COL I na concentração de 1,5 mg COL I/mL. Para a formação dessa matriz, a solução concentrada de COL I foi diluída de acordo com o seguinte protocolo: do DMEM 5 vezes concentrado foi retirada uma alíquota de 480µL, transferida para um tubo de 50 mL (Falcon) e a essa alíquota foram adicionados 5120µL DMEM 1x, 189µL de NaOH e 2400µL de colágeno 5 mg/mL, de tal forma que a concentração final da matriz

correspondesse a 1,5 mg/mL e pH 7,0. Todo processo foi feito em gelo para evitar que a gelificação ocorresse antes do tempo ideal. Aos poços das placas de 24 poços foram adicionados 300µL da solução de COL I a 1,5 mg /mL e as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 1 hora, para finalização do processo de gelificação. Em seguida, foi adicionado 1 mL da suspensão de macrófagos na concentração de  $6 \times 10^5$  células/mL (Figura 10).



**Figura 9: Montagem da camada de biofilme (2D).** As superfícies de placas de 24 poços foram cobertas com 300 µL solução de COL I a 50µg/mL em DMEM. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida, o excesso da solução foi aspirado e 1 mL da suspensão de macrófagos em meio DMEM completo ( $6 \times 10^5$  células/poço) foi distribuído nos poços.



**Figura 10: Montagem da matriz de COL I (3D).** Nesse modelo, 300 µL solução de COL I a 1,5 mg COL I/mL foram distribuídos nos poços de placas de 24 poços. Sobre a matriz gelificada foram adicionados os macrófagos na concentração de  $6 \times 10^5$  células/poço em 1mL.

#### **4.5 - Obtenção de macrófagos e avaliação da carga parasitária *in vitro***

Macrófagos peritoneais residentes foram obtidos de camundongos BALB/c através do lavado da cavidade peritoneal com 5 mL de DMEM (Gibco-Invitrogen) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 50 $\mu$ M de  $\beta$  mercaptoetanol, 1mM de piruvato, 10 $\mu$ g/mL de gentamicina e 0,1 mM aminoácidos não-essenciais (todos da Gibco-Invitrogen) e sem soro. As células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando-se Azul de Trypan (Sigma) para análise da viabilidade celular, ajustadas na concentração de 6X10<sup>5</sup> céls/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1 mL dessa suspensão foi distribuída em triplicatas em placas de 24 poços para cultura de células (Corning) contendo ou não uma camada de matriz de colágeno I na concentração de 1,5 mg /mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 7% CO<sub>2</sub> por 3 horas para aderência dos macrófagos. Após esse período de incubação, os macrófagos foram infectados com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* diferenciadas *in vitro* nas proporções parasito: célula de 1:1 (6x10<sup>5</sup> parasitos/poço), 3:1 (18x10<sup>5</sup> parasitas/poço) e 10:1 (60x10<sup>5</sup> parasitas/poço). As placas foram incubadas ON a 37°C e 7% CO<sub>2</sub>. Após esse período, os poços foram lavados com HBSS (Gibco-Invitrogen) sem soro para remoção dos parasitas não interiorizados e, mantidos em meio DMEM suplementado (Gibco-Invitrogen) contendo 1% de nutridoma (Roche). A multiplicação dos parasitas foi avaliada após sete e dez dias em cultura pela contagem em câmara de Neubauer das formas tripomastigotas e amastigotas livres nos sobrenadantes. Em alguns experimentos a contagem das tripomastigotas livres foi realizada 48 e 72 horas após a infecção.

Em algumas experiências, os macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c normais cultivados ou não sobre uma camada de matriz de colágeno na concentração de 1,5 mg/mL, foram estimulados com 10  $\mu$ g/ml de lipopolissacarídeo (LPS de *Salmonella typhimurium*, Sigma Chemical Co.) e 40 U/mL de IFN- $\gamma$  por 24 horas. Os sobrenadantes destas culturas foram coletados e estocados a -20 °C para dosagem de citocinas.



#### **4.6- Obtenções de células B1**

As células foram coletadas a partir do peritônio de camundongos por repetidas lavagens com meio RPMI-1640 (Gibco-Invitrogen) suplementado (2 mM de L-glutamina, 50 $\mu$ M de  $\beta$  mercaptoetanol, 1mM de piruvato, 10 $\mu$ g/mL de gentamicina, 0,1mM de aminoácidos não essenciais), sem soro e incubados a 37 °C em atmosfera de 7% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram aspirados para eliminar as células não aderentes e foi adicionado meio RPMI-1640, suplementado (2 mM de L-glutamina, 50 $\mu$ M de  $\beta$  mercaptoetanol, 1mM de piruvato, 10 $\mu$ g/mL de gentamicina, 0,1mM de aminoácidos não essenciais) contendo 10% de SFB. As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 7% de CO<sub>2</sub> durante 5 dias. Durante este período as células B-1 proliferam como células livres flutuantes.

#### **4.7- Cytospin**

Os macrófagos sobre o Gel foram submetidos a um processo de digestão enzimática com uma solução de colagenase 300  $\mu$ L /poço (Tipo I A, Sigma) a 1mg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 7% CO<sub>2</sub> por 20 minutos e em seguida as células obtidas após esta digestão enzimática foram ajustados para 1X10<sup>5</sup> células/200 $\mu$ L e citocentrifugadas a 6000rpm por 3 minutos em centrífuga (CT-2000 CIENTEC). Após centrifugação as células foram coradas utilizando-se o kit Instant Prov (LABORCLIN) e depois observadas no microscópio ótico (ZEISS, 100X).

#### **4.8- Dosagem de citocinas por ELISA**

As citocinas TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos coletados 48 horas após a infecção, pelo método imunoenzimático do tipo “sandwich” (ELISA) utilizando-se o protocolo descrito pelo fabricante. Os sobrenadantes foram mantidos a 20 °C até o momento da utilização. Para dosagem do TGF- $\beta$ , os sobrenadantes foram previamente acidificados com HCl 1N para ativação dessa citosina e posteriormente

neutralizados com uma solução de NaOH 1,2 N e HEPES 0,5M. Resumidamente placas de 96 poços para ELISA (Corning) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina a ser dosada (50µl/poço) diluídos em tampão carbonato pH 9,0 e incubadas “overnight” (ON) a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas com solução tamponada com fosfatos pH 7,2 (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) (Sigma Chemical Co.) em lavador automático de placas (Skan Washer 400, Molecular Devices, USA). Depois dessa etapa, 100µL de PBS suplementado com 10% de SFB, foram distribuídos nos poços e a placa incubada durante 2 horas à 37 °C. Após esse período, o PBS contendo 10% de SFB foi descartado e as diferentes concentrações das respectivas citocinas recombinantes e as amostras a serem testadas (50 µl/poço), foram acrescentadas aos poços em triplicatas. As placas contendo as amostras e a curva-padrão foram incubadas ON a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T e os anticorpos secundários marcados com biotina e específicos para as citocinas foram acrescentados aos poços. As placas foram incubadas por 2 horas, a 37 °C e, então foram lavadas com PBS-T. A reação foi revelada com fosfatase alcalina conjugada a estreptoavidina (Southern Biotechnology Associates INC. Birmingham, AL) usando paranitrofenol fosfato como substrato (Sigma Chemical Co.). A leitura foi realizada por absorvância em 405 nm através de um leitor de ELISA (VERSA<sub>Max</sub> Microplate Reader, Molecular Devices, USA).

#### ***4.9- Dosagens de prostanóides por ELISA-Quantificação de mediadores lipídicos por Ensaio Imuno-Enzimático (EIA)***

Para a dosagem de prostanóides, os macrófagos que foram cultivados sobre matriz e foram submetidos a um processo de digestão enzimática ou não, com uma solução de colagenase 300 µL /poço (Tipo I A, Sigma) a 1mg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 7% CO<sub>2</sub> por 20 minutos e em seguida o material resultante da digestão enzimática foi transferido para um separador de células (cell strainer, FALCON). O sobrenadante resultante foi estocado a -20 °C até o momento da análise.

A quantificação de eicosanóides foi realizada a partir de sobrenadantes obtidos de macrófagos infectados ou não, utilizando kits de EIA de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical). Resumidamente, em uma placa sensibilizada e bloqueada foram adicionadas amostras ou padrão, tracer e anticorpos, e a placa foi incubada overnight, 4<sup>o</sup>C. Após 5 lavagens, a reação foi revelada adicionando o reagente Ellman's. A intensidade da coloração – inversamente proporcional à quantidade de eicosanóide contida na amostra – foi quantificada em um comprimento de onda de 405 nm. Com os valores da curva padrão foi realizada uma regressão não linear no programa GraphPad Prism 5 para determinação da concentração de eicosanóides presentes nas amostras. Os resultados foram expressos como pg/ mL.

#### ***4.10 Microscopia Confocal***

Para avaliação morfológica do espalhamento dos macrófagos por análise dos filamentos de actina-F, com anticorpos fluorescentes as células foram cultivadas sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro cobertas com COL I no modelo 3D e infectados na proporção de 1:1 ON em estufa a 37 °C e 7% de CO<sub>2</sub>. A seguir os poços foram lavados para remoção dos parasitos não interiorizados. As células foram lavadas com PBS, fixadas por 20 minutos a temperatura ambiente em PBS contendo 4% de paraformaldeído. As amostras fixadas foram lavadas 3 vezes em PBS por 10 minutos cada uma, bloqueadas 2 vezes com Cloreto de Amônio 50mM em PBS pH 8,0 por 15 minutos cada, em seguida lavadas 2 vezes com PBS por 10 minutos cada. As células foram permeabilizadas 2 vezes por 15 minutos cada em tampão PBS contendo Triton X-100 a 0,5%. Ao término da permeabilização, as células foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora com Fc block (1:100) diluído em tampão PBS-5% BSA, 0,1% Triton X-100, 0,05% Tween-20, 0,01% gelatina e 10% soro de cabra. Após este período as células foram incubadas em tampão PBS-BSA (3%), gelatina 0,01%, Tween-20 (0,05%), Triton X-100 (0,1%) e anti-colágeno I/coelho Ab cam Rb Col I Ab2 1286 (Invitrogen) na diluição (1:250) overnight a 4 °C. As amostras foram lavadas 2x por 5 minutos em PBS-Tween-20 (0,25%), lavadas 3x por 5 minutos cada com PBS-Triton X-100 (0,25%), incubadas com

o anticorpo secundário anti-Rabbit faloidina/Alexa 546 (1:100) (Invitrogen), diluída em tampão PBS-BSA 3%, Triton X-100 (0,1%), Tween-20 (0,05%), gelatina 0,01% e soro normal de cabra 10%, incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas 3x por 5 minutos com tampão PBS-Triton 0,25%, incubadas com faloidina/Alexa 488 (1:50) (Invitrogen), diluída em PBS por 15 minutos. Para remoção do excesso de faloidina as células foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada com PBS.

As células também foram marcadas com dihidrocloro 4',6' -diamidino-2-fenilindole (DAPI; Sigma) diluído da seguinte forma: solução I: 5µL DAPI (10mg/mL) em 995 µL em PBS, Solução II (solução de trabalho) 10 µL de solução I em 990 µL de PBS, para observação dos núcleos celulares. Resumidamente, as células foram incubadas com DAPI por 3 minutos, lavadas 3x por 5 minutos com PBS, lavadas 4x com água destilada e montadas em Vectashield (Vector Laboratories). As imagens foram capturadas usando (Zeiss LSM 510 meta) para avaliação por microscopia confocal.

#### **4.11 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).**

Para a realização da MEV, lamínulas de 13 mm de diâmetro foram distribuídas em placas de 24 poços e as mesmas foram cobertas com uma camada de COL I a 50µg/mL e 1,5 mg /mL, modelos 2D e 3D, respectivamente. Depois da solidificação do COL I nas duas concentrações, 1 mL da solução de macrófagos na concentração de  $6 \times 10^5$ /mL foi distribuída nos poços e as placas incubadas em estufa a 37°C e 7% CO<sub>2</sub>. Após três horas de aderência, as monocamadas de macrófagos foram infectadas ou não com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* e as placas incubadas ON em estufa 37°C e 7% CO<sub>2</sub>. Após esse período os poços foram lavados com HBSS sem soro para remoção dos parasitas não interiorizados. Após 24 e 48 horas de incubação as placas foram lavado com salina tamponada com fosfato (PBS - 0.15M NaCl + 0.01M tampão fosfato de sódio, pH 7.2) e fixado overnight em tampão Cacodilato de sódio 0,1M contendo glutaraldeído grau II (1%) e paraformaldeído (1%) recém preparado. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio (2%) e ferrocianeto de potássio (0,8%), ambos

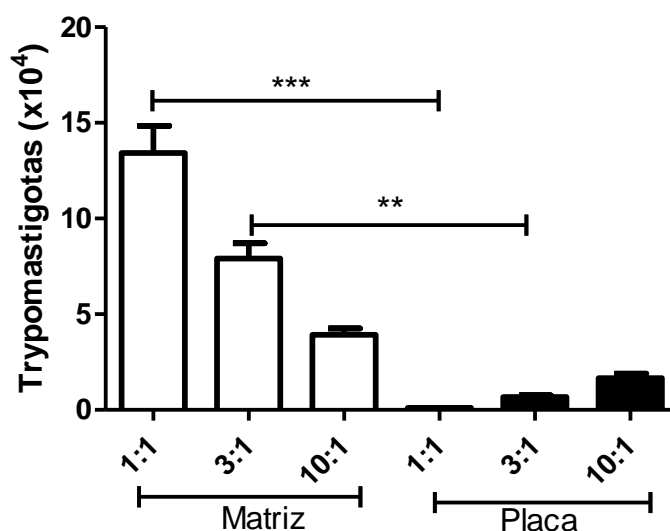
feitos em PBS por 40 minutos. Após esse período as amostras foram lavadas 4 vezes em PBS, desidratadas em concentrações crescentes de etanol que variaram de 30%,50%,70%,90% e 100% por 10 minutos cada, e secas pelo método do ponto crítico, utilizando CO<sub>2</sub> como fluido de transição. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com uma camada de ouro de 20nm de espessura foi sobreposta às amostras, as quais foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5310).

#### **4.12- Análises Estatísticas**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 5 (Sigma) para Windows utilizando o método “One-way ANOVA”.

## 5. RESULTADOS

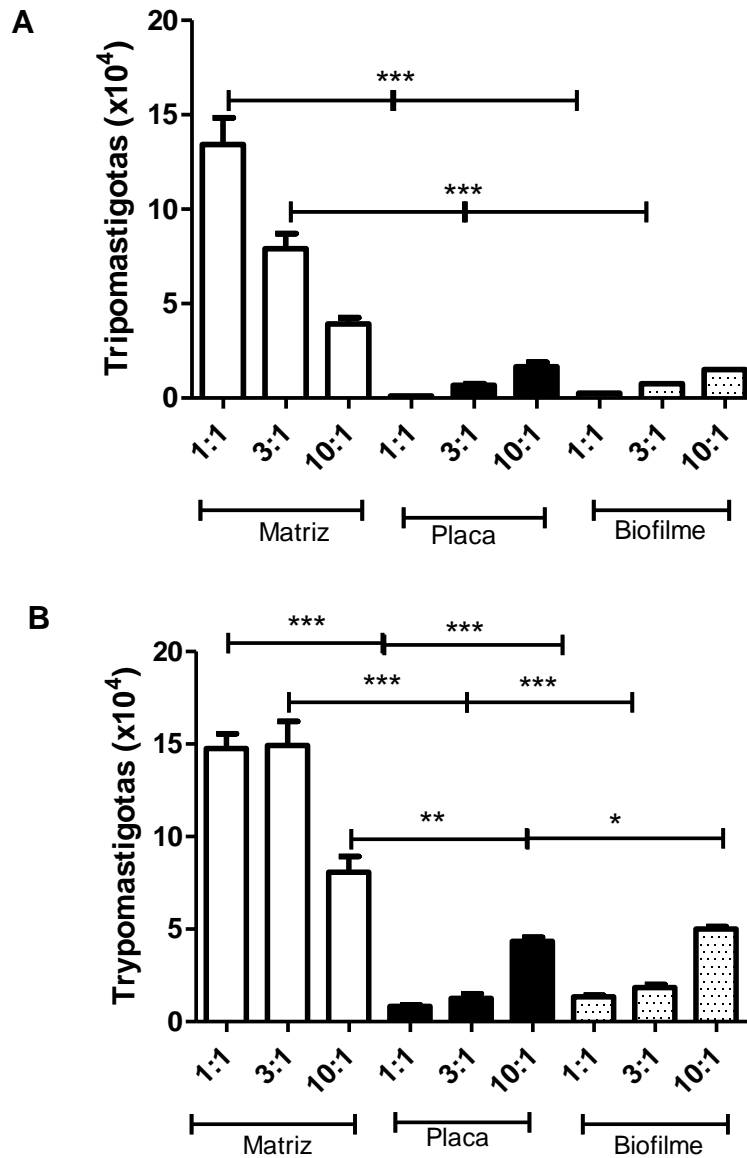
Neste estudo investigou-se a influência da matriz extracelular no favorecimento da replicação do *T. cruzi in vitro*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c normais foram cultivados sobre uma camada de colágeno I no modelo 3D ou diretamente na superfície de poliestireno das placas de 24 poços e infectados com formas tripomastigotas metacíclicas do parasito. A figura 11 mostra que após 7 dias em cultura houve um crescimento acentuado do parasito quando os macrófagos foram plaqueados sobre o matriz de COL I. Esse efeito significativo foi observado em todas as relações parasito:célula testadas. Por outro lado, quando os macrófagos foram cultivados diretamente na superfície de poliestireno a replicação do *T. cruzi* não foi tão acentuada após 7 dias de incubação. Nesse modelo, a maior replicação do *T. cruzi* ocorreu na proporção de 10 parasitos para um macrófago.



**Figura 11:** Exacerbação da replicação do *T.cruzi* em macrófagos cultivados sobre matriz de colágeno I. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $3 \times 10^5$ ) foram cultivados em triplicatas sobre matriz de COL I (1,5 mg/mL) ou diretamente sobre os poços das placas de 24 poços e infectados POR -----HORAS com formas metacíclicas do *T. cruzi* clone Dm28c nas proporções de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ) e de 10:1 ( $60 \times 10^5$ ). Após sete dias em cultura as formas tripomastigotas livres nos sobrenadantes foram contadas em câmara de Neubauer. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Resultado representativo de três experimentos realizados independentemente.  $P < 0,05$

Com o objetivo de verificar se a replicação exacerbada do *T. cruzi* em macrófagos murinos infectados *in vitro* estava relacionada com o efeito químico ou mecânico da matriz, foram utilizadas as seguintes variáveis: macrófagos peritoneais cultivados e infectados com formas metacíclicas do *T. cruzi* sobre camada de COL I na concentração de 50 µg/mL (biofilme), sobre camada de matriz COL I a 1,5 mg/mL (3D) e diretamente na superfície de poliestireno de placas de 24 poços.

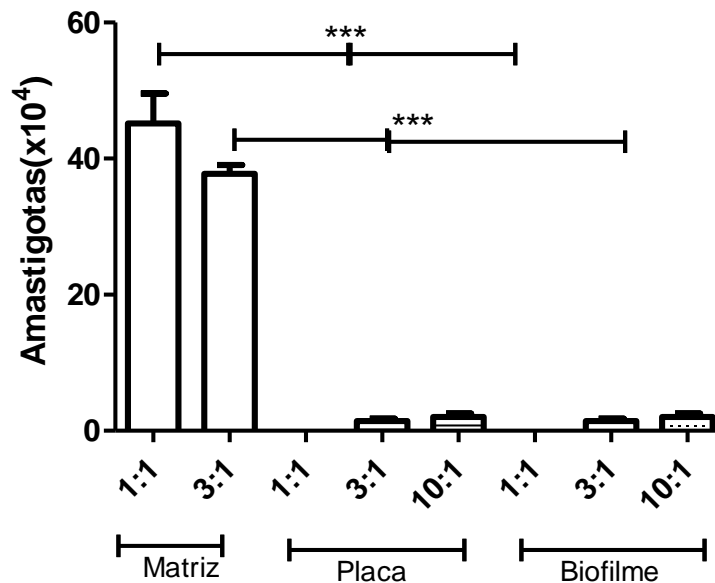
Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que no biofilme (modelo 2D), o número de parasitas liberados é semelhante ao observado quando macrófagos foram cultivados diretamente na placa, sugerindo que o efeito é mecânico e não químico. Como observamos em experiências anteriores, o aumento acentuado na replicação do *T. cruzi* ocorreu na placa de 24 poços que foram revestidas com COL I a 1,5 mg/mL (modelos 3D). Esses resultados sugerem que os macrófagos cultivados em superfície 2D comportam-se diferentemente daqueles cultivados em ambiente 3D. A replicação exacerbada do parasito no modelo 3D pode estar associada as alterações na forma da célula, que apresenta a área de contato da membrana plasmática do macrófago com o substrato (a matriz de COL I) aumentada, o que estaria favorecendo a infecção da célula pelo *T. cruzi*.



**Figura 12:** Influência da matriz de colágeno no favorecimento da replicação do *T. cruzi*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre matriz de COL I ou biofilme de COL I ou diretamente sobre os poços das placas de 24 poços. Após 3 horas de adesão dos macrófagos nas diferentes superfícies, as células foram infectadas com formas metacíclicas do *T. cruzi* clone Dm28 nas relações parasito:célula de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ) e de 10:1 ( $60 \times 10^5$ ). Após sete e dez dias de infecção, as formas tripomastigotas liberadas nos sobrenadantes das culturas foram contadas usando a câmara de Neubauer. Cada barra representa a média  $\pm$  SE de triplicatas de um experimento representativo. Os experimentos foram repetidos três vezes onde foram obtidos resultados semelhantes. Figuras: A (sete dias pós infecção), B (décimo dia pós infecção).  $P < 0,05$

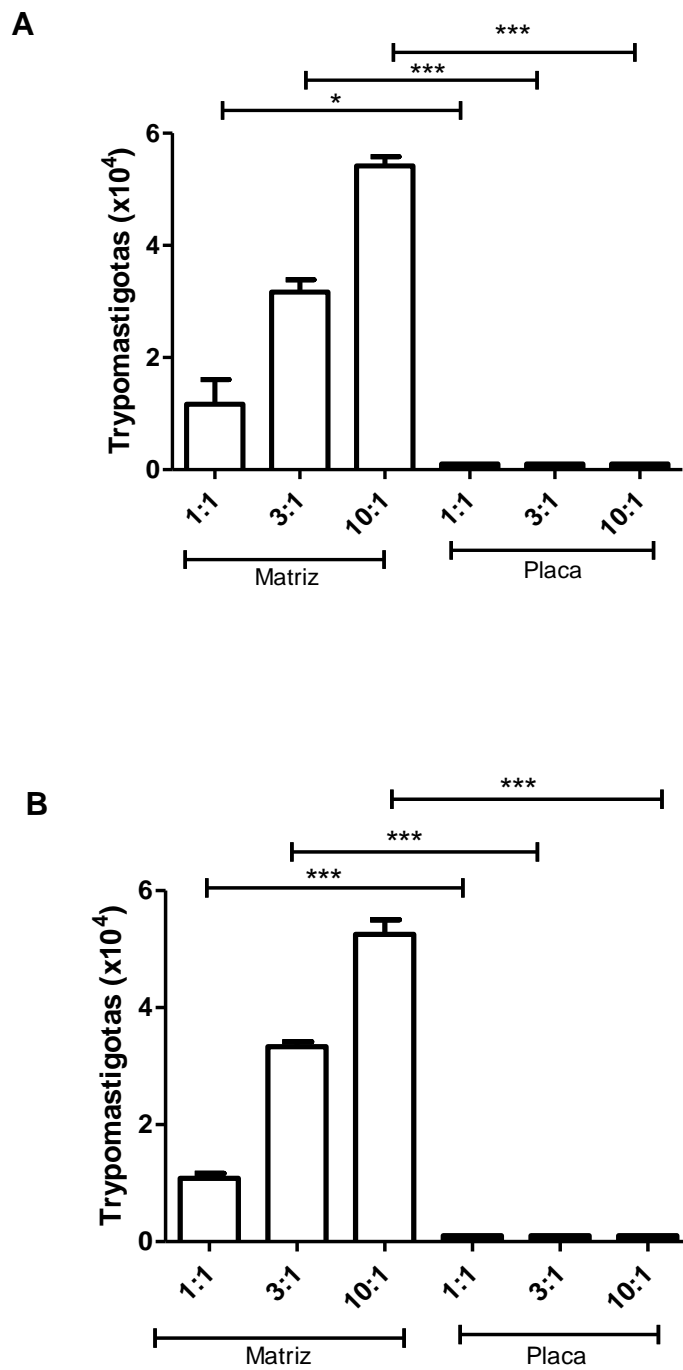


Considerando que estudos prévios mostraram que formas tripomastigotas oriundas de cultura de células se diferenciam em amastigotas em meio de cultura com ou sem soro a 37 °C ((Kanbara, 1990; Tomlinson, *et al.*, 1995)), nós decidimos investigar se essa diferenciação estava acontecendo em nosso sistema. (Tomlinson, *et al.*, 1995). Então avaliamos não só o número de tripomastigotas, mas também o número de amastigotas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e cultivados sobre camada de COL I 50 µg/mL (biofilme), sobre camada de COL I a 1,5 mg/mL (matriz) e diretamente na superfície de poliestireno de placas de 24 poços. Os resultados apresentados na Figura 13 mostram que existe uma diferença significativa do número de formas amastigotas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos cultivados sobre matriz COL I a 1,5 mg/mL quando comparado com as demais variáveis. Nessa figura foi omitido o resultado do número de formas amastigotas obtidas nas culturas de macrófagos cultivados sobre matriz e infectados na relação 10:1 porque a contagem obtida foi muito maior do que a observada nas outras variáveis. Para facilitar a compreensão e mostrar a diferença optamos por não mostrar no gráfico o resultado. Analisando esses resultados e comparando-os com os da Figura 12, podemos sugerir que o menor número de formas tripomastigotas observado no sétimo dia de incubação, nas monocamadas de macrófagos cultivados sobre camada de matriz e infectados com a maior relação parasito:célula (10:1) estava relacionado com uma liberação precoce das tripomastigotas e posterior transformação em amastigotas *in vitro*.



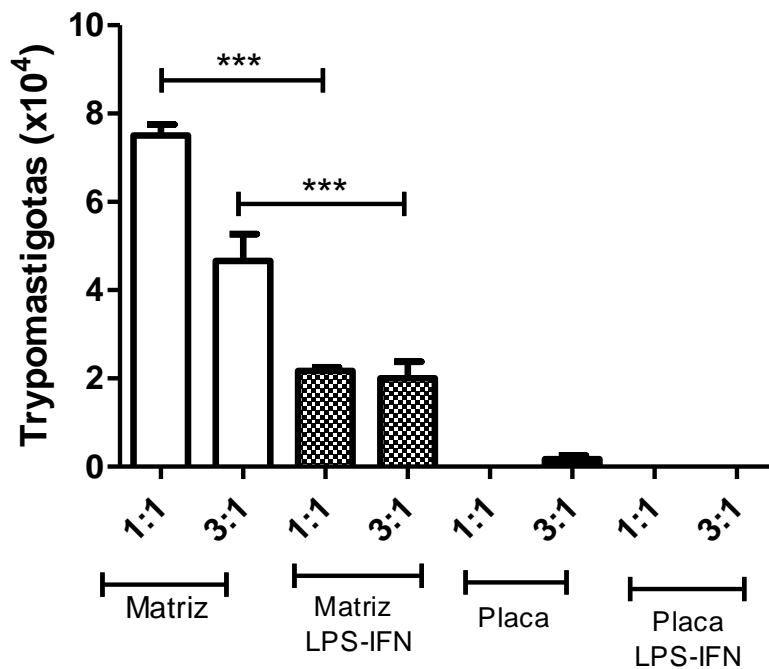
**Figura 13:** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre matriz de COL I ou biofilme de COL I ou diretamente sobre os poços das placas de 24 poços. As monocamadas de macrófagos foram infectadas após 3h de adesão com formas metacíclicas do *T. cruzi* do clone Dm28c nas relações parasito: célula de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ) e 10:1 ( $60 \times 10^5$ ). Após sete e dez dias de incubação, as formas amastigotas liberadas nos sobrenadantes das culturas foram contadas em a câmara de Neubauer. Os resultados (médias  $\pm$  SD de triplicatas) apresentados são de um experimento de representativos de três realizados separadamente.

Para verificar se os resultados apresentados nas figuras 12 e 13 estavam de fato relacionados com o liberação precoce de formas tripomastigotas por macrófagos distribuídos sobre camada de COL I a 1,5 mg/mL (matriz), a contagem dos parasitos livres no sobrenadante das células cultivadas em duas condições experimentais foi feita após 48 e 72 horas de incubação a 37 °C. Como mostrado na Figura 14, com apenas 48 horas de cultura no modelo 3D e na relação parasito:célula de 1:1, já foi possível contar formas tripomastigotas nos sobrenadantes, tendo sido observado resultado similar pela contagem após 72 horas de cultivo. Esses resultados confirmam os anteriores que mostram que a camada de COL I a 1,5 mg/mL favorece a replicação dos parasitos quando comparado com o cultivo dos macrófagos aderidos diretamente na placa ou no modelo 2D (biofilme). Com base nesses resultados, as próximas experiências foram realizadas somente com as relações parasito:célula de 1:1 e 3:1.



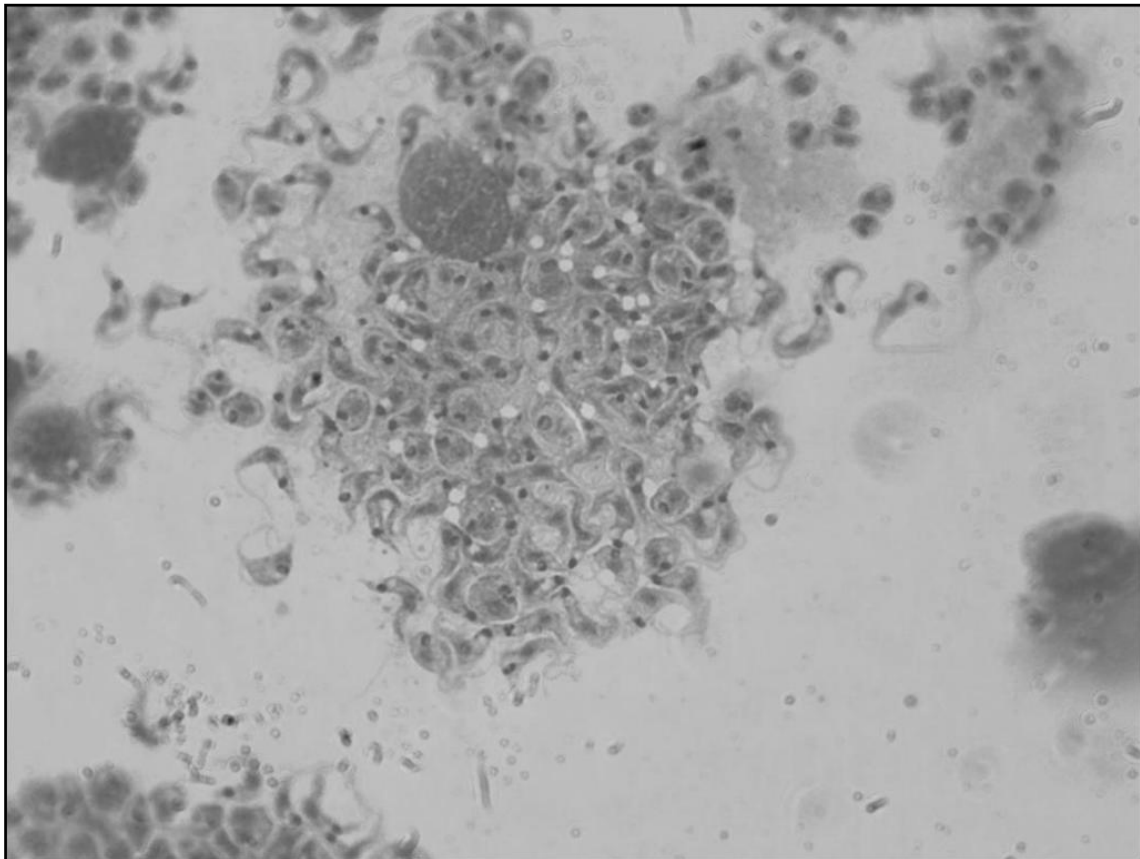
**Figura 14:** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre matriz de COL I ou diretamente sobre os poços das placas de 24 poços. As culturas celulares foram infectadas após 3h de adesão com formas metacíclicas do *T. cruzi* do clone Dm28c nas proporções de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ) e de 10:1 ( $60 \times 10^5$ ). Após 48,72h de infecção, as formas tripomastigotas liberadas nos sobrenadantes das culturas foram contados usando a câmara de Neubauer. Os dados apresentados representam um experimento demonstrativo de um n=3. Figuras: A (48h pós infecção), B (72h pós infecção).  $P < 0,05$

A atividade tripanocida dos macrófagos é mediada, principalmente, através da produção de óxido nítrico (NO). Em macrófagos, o estímulo com IFN- $\gamma$ , LPS ou ambos, promove a produção de grandes quantidades de NO (Moncada, 1992). Para verificar se haveria alguma alteração na capacidade dos macrófagos cultivados sobre camada de COL I (matriz) em exercer sua atividade tripanocida quando comparado aos cultivados diretamente na superfície de poliestireno da placa de 24 poços, as células foram tratadas com IFN- $\gamma$  e LPS por 24 horas e no sétimo de cultura o número de tripomastigotas nos sobrenadantes foi avaliado. Os resultados apresentados na Figura 15 mostram que na presença do IFN- $\gamma$  e LPS houve uma redução significativa das formas tripomastigotas livres nos sobrenadantes nos poços em que os macrófagos foram cultivados sobre camada de Colágeno I (matriz), quando comparado com os macrófagos controle cultivados nas mesmas condições mas que não foram estimulados pelo IFN- $\gamma$  e LPS. Resultados similares foram observados nos macrófagos cultivados diretamente sobre a superfície da placa, onde também observamos uma diminuição das tripomastigotas nos sobrenadantes. Embora não tenhamos analisado a produção de nitritos dessas culturas, nossos dados sugerem que nosso modelo de cultura 3D é funcional e a presença do Colágeno I não exerceu nenhum efeito sobre a produção de NO.



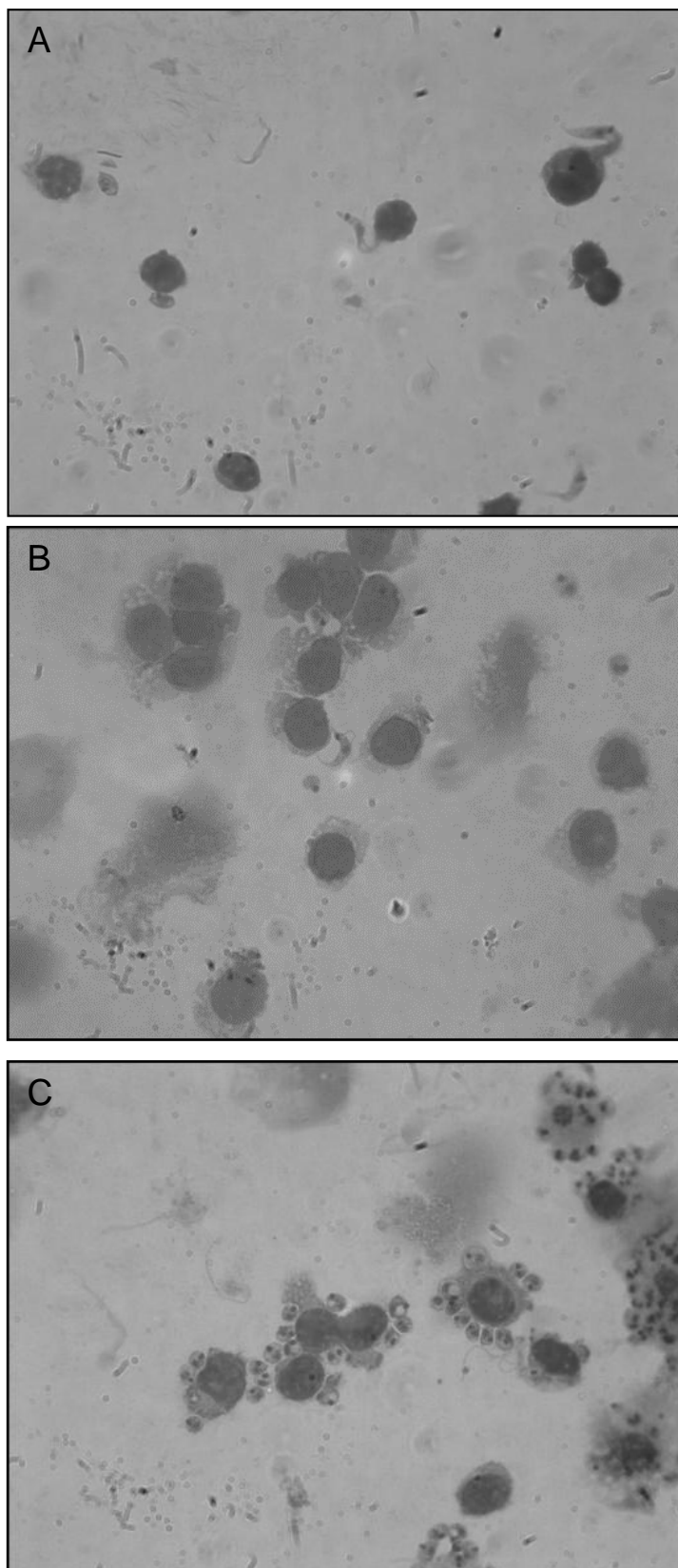
**Figura 15:** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre matriz de COL I ou diretamente sobre os poços das placas de 24 poços e incubadas por 3 horas para adesão a 37 °C com 7% de CO<sub>2</sub>. As culturas celulares foram infectadas ON com formas metacíclicas do *T. cruzi* do clone Dm28c nas proporções de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ) estimulados com 10 µg/ml de lipopolissacarídeo (LPS de *Salmonella typhimurium*, Sigma Chemical Co.) e 40 U/mL de IFN-γ por 24 horas. Após 7 dias de infecção, os parasitas liberados nos sobrenadantes das culturas foram contados usando a câmara de Neubauer. Os resultados (médias ± SD de triplicatas) apresentados são representativos de três experiências realizadas separadamente.

Como já foi mencionado, as formas amastigotas se dividem intensamente no citoplasma da célula hospedeira, depois se diferenciam em tripomastigotas e em seguida rompem a membrana da célula. Para uma observação mais detalhada do macrófago cultivado sobre camada de COL I (matriz, gel ??) e infectado pelo *T. cruzi*, setenta e duas horas após a infecção das células as mesmas foram submetidas ao processo de digestão enzimática com Colagenase I. As suspensões obtidas foram utilizadas no preparo de lâminas utilizando-se Citospin. A avaliação das lâminas em microscópio ótico mostrou macrófagos intensamente parasitados e formas tripomastigotas rompendo a membrana da célula hospedeira (Figura 16).



**Figura16:** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ /poço) foram distribuídos em poços de placas de 24 poços cobertos com a matriz de COL I e deixadas aderir por 3 horas a  $37^\circ\text{C}$  com 7% de  $\text{CO}_2$ . As células foram infectadas ON com formas metacíclicas do *T. cruzi* do clone Dm28c nas proporções de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ). Depois dessa incubação os poços foram lavados para remoção dos parasitos não interiorizados. A digestão enzimática com collagenase foi realizada 72 pós-infecção e a suspensão obtida foi utilizada na preparação de lâminas por Citospin. As lâminas foram fixadas e coradas utilizando-se o kit Instant Prov (LABORCLIN) e depois observadas no microscópio ótico (ZEISS, 100X).

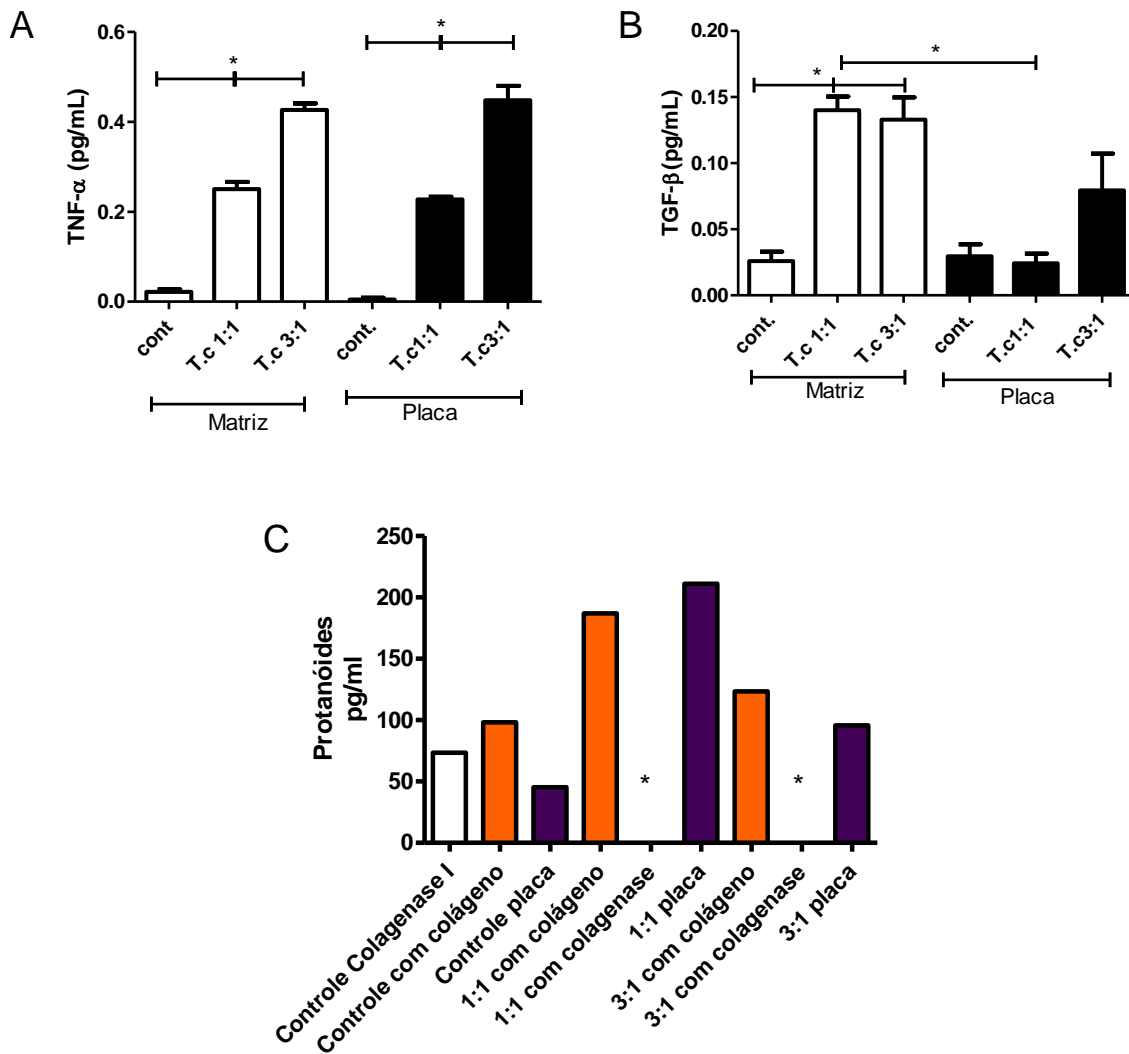
Com o objetivo de avaliar se as formas tripomastigotas liberadas pelas células quando cultivadas sobre a matriz poderiam infectar outras células, procedemos da seguinte forma: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre Gel de COL e após 3h de adesão foram infectados com formas metacíclicas do *T. cruzi* na proporção de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ) por 24h. Após adição dos parasitos as placas foram lavadas para retirada dos parasitos que não interiorizados. Quando já havia liberação de tripomastigotas pelos macrófagos infectados previamente, ou seja 48h depois, foram adicionadas células B1 isoladas a partir de lavado peritoneal e diferenciadas pelo método Após um período adicional de 24h de interação, foi feito um citospin e as lâminas foram coradas por panótico rápido e foi verificado que o parasito estava tentando infectar as células B1 e observamos também formação de rosetas em torno das mesmas (Figura 17).



**Figura17:** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre matriz de COL I (A, B, e C). As culturas celulares foram infectadas após 3h de adesão com formas metacíclicas do *T. cruzi* nas proporções de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), 72h foi feito um citospin e as lâminas foram coradas por panótico rápido. As lâminas foram fixadas e coradas utilizando-se o kit Instant Prov (LABORCLIN) e depois observadas no microscópio ótico para quantificação das formas amastigotas.

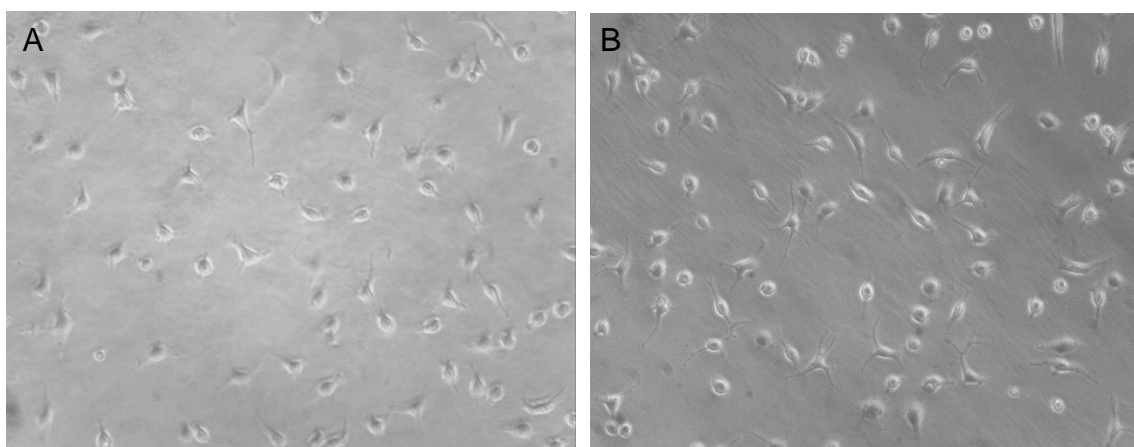


Sabe-se que a citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  produzida pelos macrófagos é essencial na resposta imune contra o *T. cruzi*. Como mostra a Figura 18, não houve diferença na produção de TNF- $\alpha$  quando os macrófagos foram cultivados e infectados sobre matriz de COL I a 1,5 mg/mL ou diretamente na superfície de poliestireno da placa de 24 poços após 48 horas de infecção. O pico de produção de TNF- $\alpha$  foi observado na relação parasito:célula de 3:1 nas duas variáveis experimentais. Por outro lado, o TGF- $\beta$  tem sido implicado como um importante mecanismo de escape do parasita. No nosso modelo experimental, onde macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços que foram previamente cobertas ou não com COL I a 1,5 mg/mL e depois infectados com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi*, verificamos que a maior produção de TGF- $\beta$  foi observada quando os macrófagos foram cultivados sobre a matriz e que não houve diferença significativa nas duas relações parasito:célula testadas. Avaliamos também a produção de prostanóides em nosso sistema. Além da quantificação nos sobrenadantes obtidos após 48 horas de incubação e para melhor quantificação de prostanóides após esse período, os macrófagos cultivados sobre matriz de COL I foram tratados com Colagenase tipo I A, Sigma e, em seguida, o material passado no *cell strainer* para retenção dos detritos e obtenção do sobrenadante. Este tratamento possibilitou a quantificação mais precisa e mostrou uma produção acentuada de prostanóides nas duas relações parasito:célula quando comparado aos sobrenadantes obtidos de macrófagos cultivados em poços cobertos com COL I sem digestão enzimática ou distribuídos diretamente na superfície de poliestireno das placas de 24 poços.

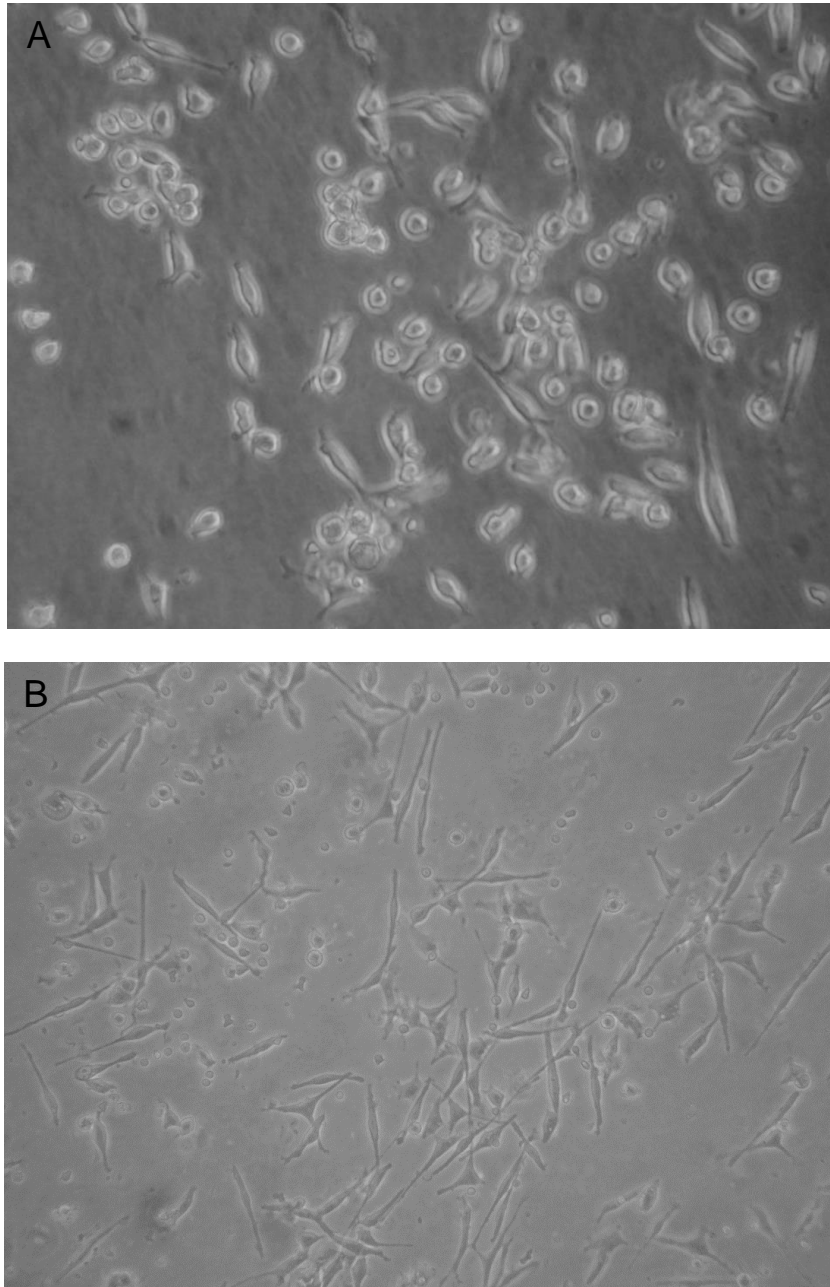


**Figura 18:** Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e Prostanóides. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre a matriz de COL I ou sobre a superfície de poliestireno das placas de 24 poços. As culturas celulares foram infectadas após 3h de adesão com formas metacíclicas do *T. cruzi* nas proporções de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), de 3:1 ( $18 \times 10^5$ ) e incubadas ON em estufa a 37 °C com 7% de CO<sub>2</sub>. Após 48h de cultura a produção de TNF- $\alpha$  (A), TGF- $\beta$  (B) e prostanóides (C) foi avaliada nos sobrenadantes. Resultados de um experimento representativo de três realizados. \* acima de 1000pg/mL.

Para avaliar as mudanças morfológicas dos macrófagos foram utilizadas diferentes técnicas de microscopia. Inicialmente, cultivamos macrófagos peritoneais de camundongos normais num sistema amplamente utilizado que é sobre a superfície de poliestireno de placas de 24 poços. Depois de aderidas, as células infectadas ON com formas tripomastigotas metacíclicas do clone Dm 28c do *T. cruzi* ou não (grupo controle). As Figuras A e B mostram que os macrófagos do grupo controle não infectados estavam arredondados em relação aos macrófagos infectados, que estavam um pouco mais alongados. Quando os macrófagos foram cultivados sobre uma camada de COL I a 1,5 mg/mL, as células apresentaram-se de forma espreada, com prolongamentos (Figura 19 e 20) quando comparada com as células controle que apresentaram uma morfologia arredondada.

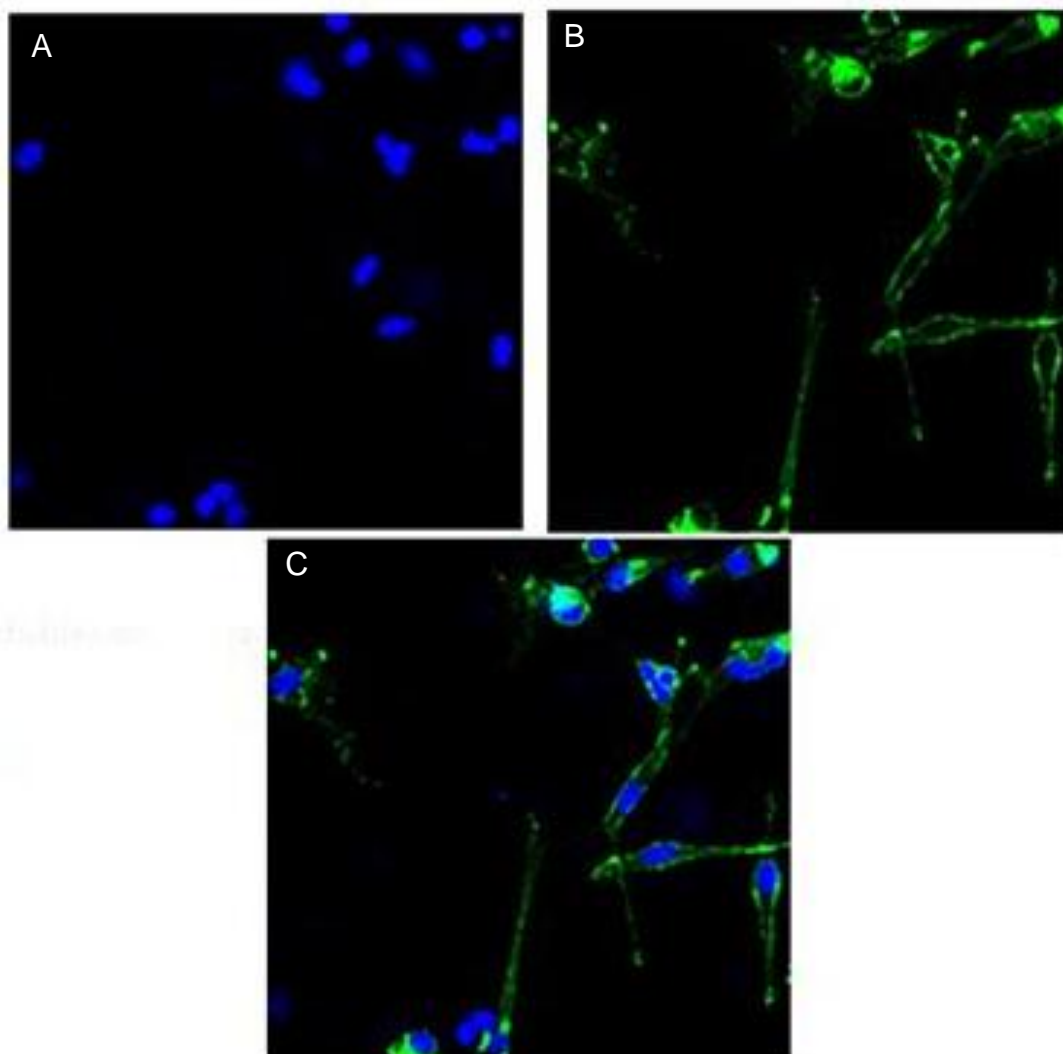


**Figura 19:** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados sobre placas de 24 poços. Após 48h de infecção as imagens foram registradas (aumento 400x). As imagens foram obtidas de campos aleatoriamente escolhidos em cada poço com uma câmera digital (SONY) acoplada ao microscópio invertido de campo claro (OLYMPUS IX70). Figura A (células controle em placa), B (células infectadas em placa).



**Figura 20:** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ ) foram cultivados diretamente sobre uma camada de matriz de COL I. Após 48h de infecção as imagens foram registradas (aumento 400x). As imagens foram obtidas de campos aleatoriamente escolhidos em cada poço com uma câmera digital (SONY) acoplada ao microscópio invertido (OLYMPUS IX70). Figura A (células controle sobre matriz), B (células infectadas sobre matriz).

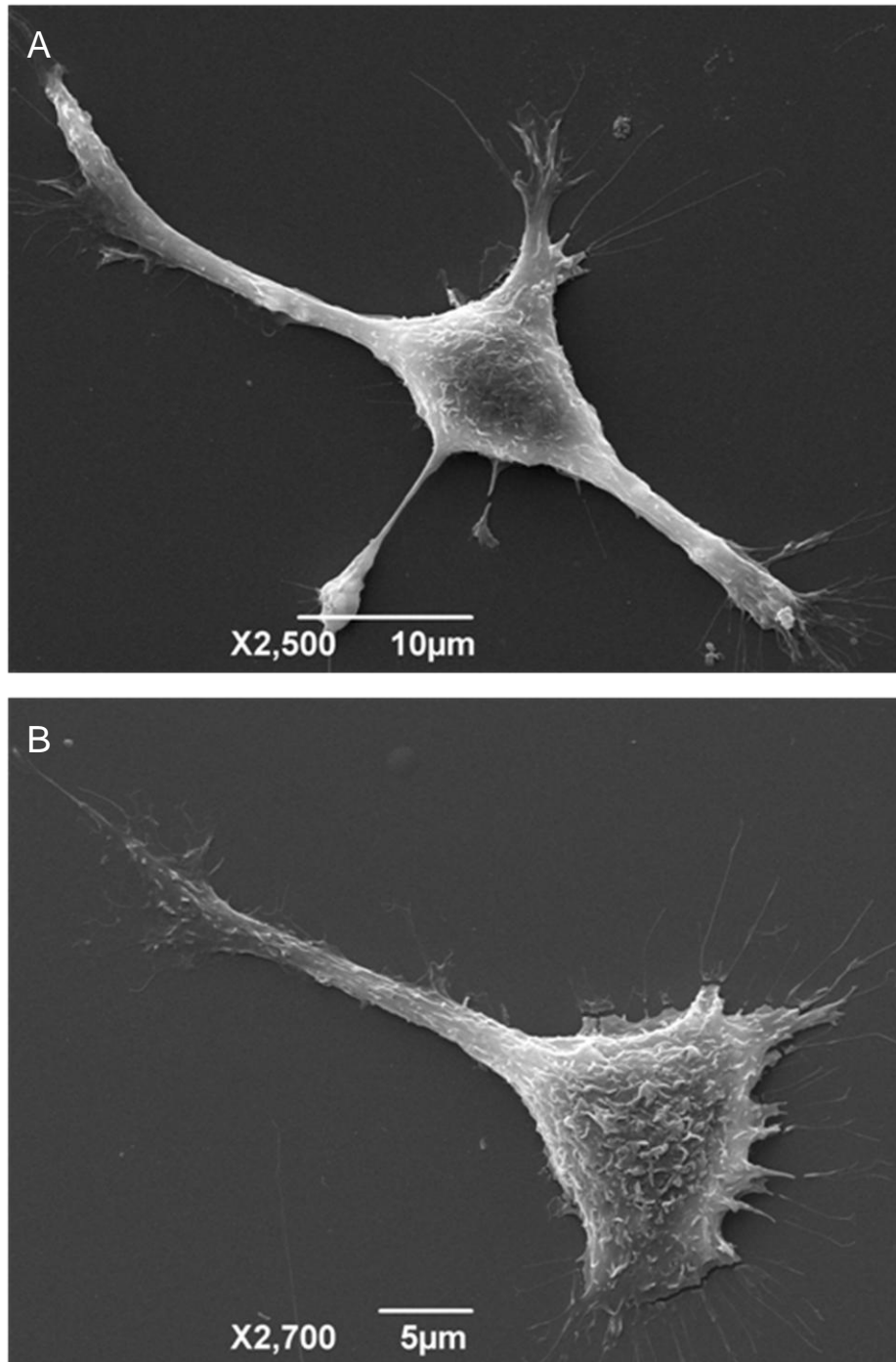
O citoesqueleto de actina é o determinante principal da forma, fornecendo a base estrutural para a motilidade, contratilidade e transporte intracelular. Nós marcamos o citoesqueleto de actina com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 de macrófagos cultivados sobre lamínulas na presença de COL I a 1,5 mg/mL e infectados com *T. cruzi*. As imagens obtidas por microscopia confocal mostram que os macrófagos cultivados sobre matriz de colágeno I apresentam-se com finas extensões e é possível observar contatos célula-célula (Figura 21).



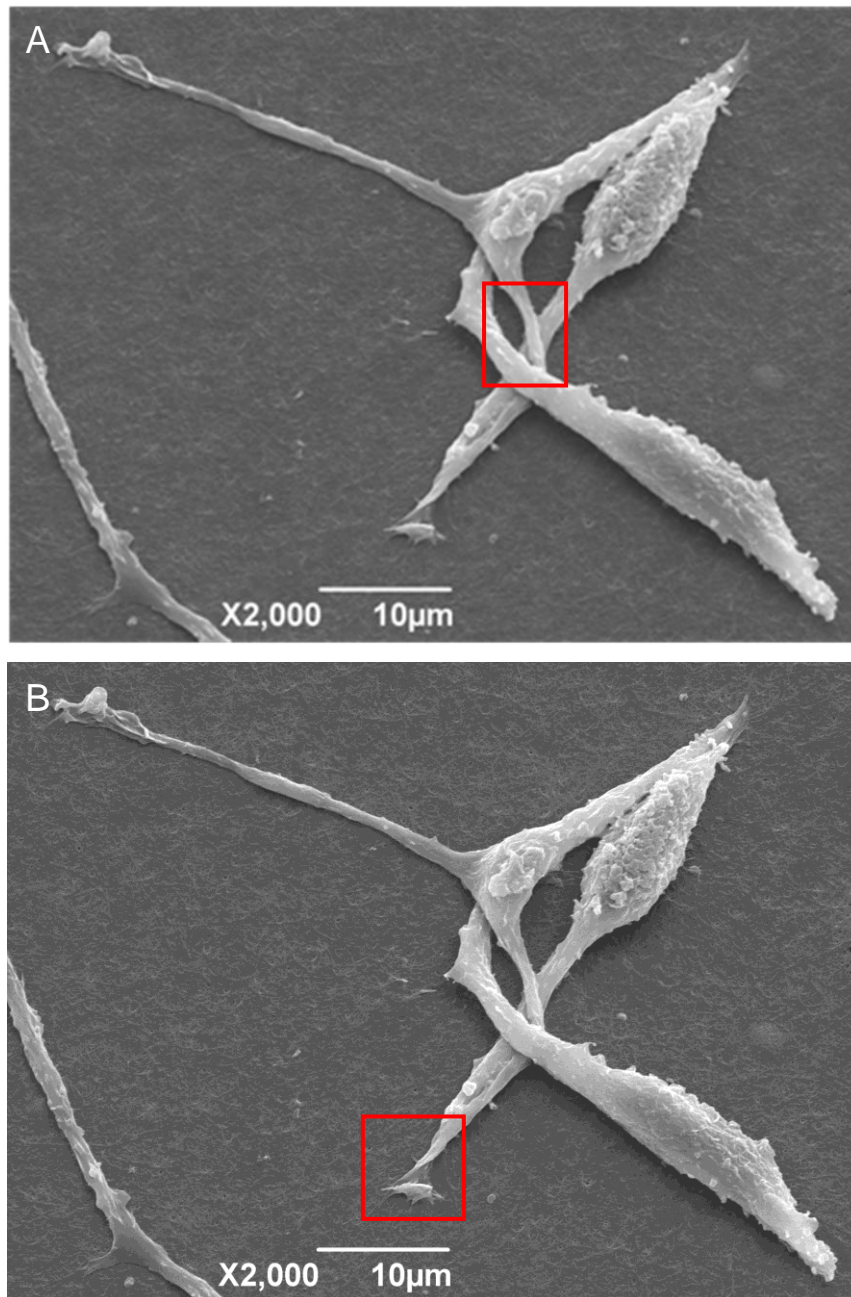
**Figura 21:** Avaliação morfológica dos macrófagos por microscopia confocal: As monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$  /mL) cultivados em lamínulas revestidas com Matriz de COL I e incubadas por 3 horas para adesão das células. Os macrófagos foram infectados ON com formas metacíclicas do *T.cruzi* do clone Dm28c na proporção de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ) e após esse período os parasitas não interiorizados foram removidos. As células foram fixadas, marcadas com DAPI para visualização do núcleo (azul; A) e F-actina com faloidina conjugada a Alexa Fluor® 488 (verde; B) 48h após infecção. Em C as sobreposições das imagens. As imagens representativas de microscopia confocal.

Para explorarmos ainda mais as alterações morfológicas e a adesão dos macrófagos realizamos a análise por microscopia eletrônica de varredura de células cultivadas sobre matriz de COL I (modelo 3D) ou em condições 2D, quando os macrófagos são cultivadas sobre superfície rígida, realizamos a análise por microscopia eletrônica de varredura. As imagens obtidas mostraram que as células cultivadas diretamente sobre superfície de poliestireno da placa de 24 poços apresentavam-se arredondadas ou estelares, um pouco maiores e, mais espalhados quando infectados pelo *T. cruzi*, sugerindo um efeito direto da infecção pelo parasito no espreadimento dos macrófagos (Figura 22). Nos macrófagos cultivados sobre camada de COL 1 a 1,5 mg/mL (matriz) observamos alteração do formato das células, que passaram do formato esférico para a forma espreada, apresentando prolongamentos semelhantes a filopódios (Figura 23). Entretanto, experiências adicionais com marcadores específicos são necessárias para nos certificarmos que esses prolongamentos são de fato filopódios. As imagens também mostram o contato célula-célula, com sobreposição dos prolongamentos (detalhe marcado em vermelho) e o “ancoramento” dos prolongamentos na matriz de colágeno I (detalhe em vermelho).

A Figura 25 mostra que o macrófago infectado está se “embrenhando” e remodelando a malha de colágeno I para seu deslocamento. Como mostrado por MEV, as formas tripomastigotas livres na cultura também aderem e migram através da malha de colágeno I (Figura 26)

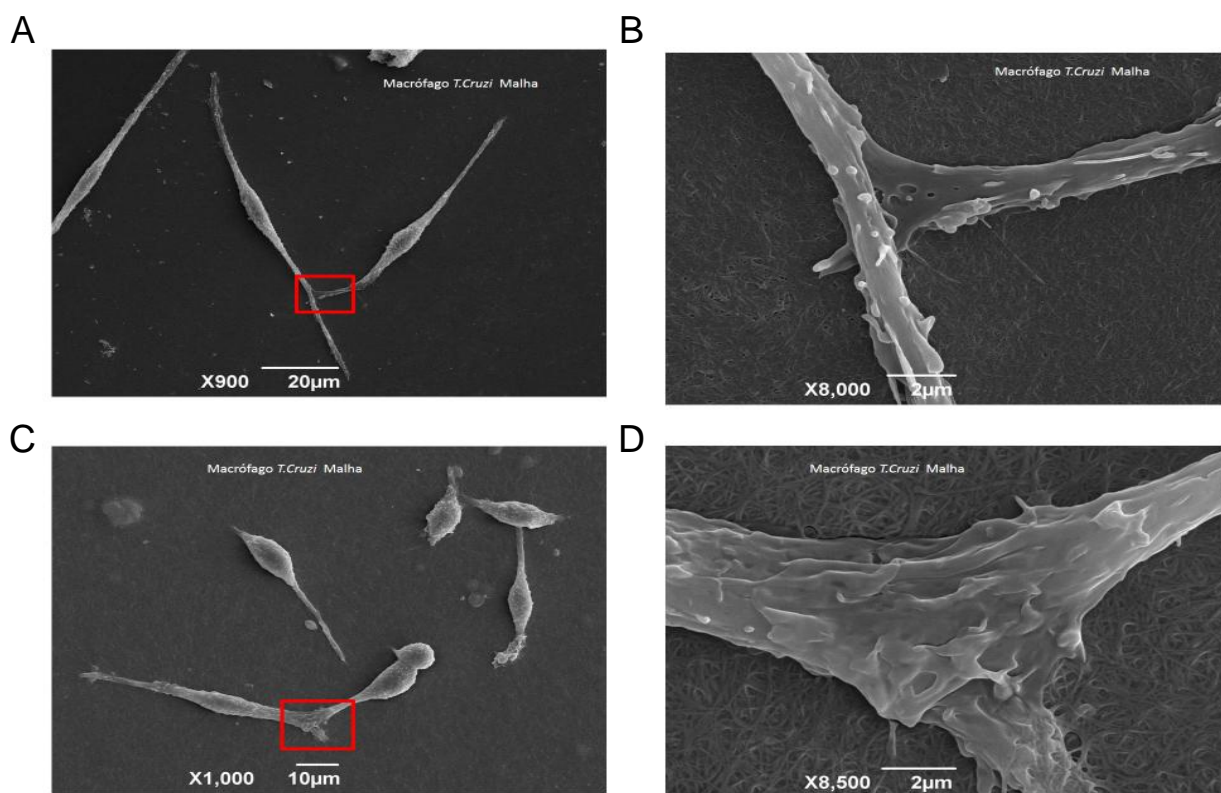


**Figura 22:** Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$  /mL) cultivados sobre superfície rígida (A e B). As culturas celulares foram infectadas após 3h de adesão com formas metacíclicas do *T.cruzi* do clone Dm28c nas proporções de 1:1 ( $6 \times 10^5$ ), as imagens foram registradas 48h após infecção.

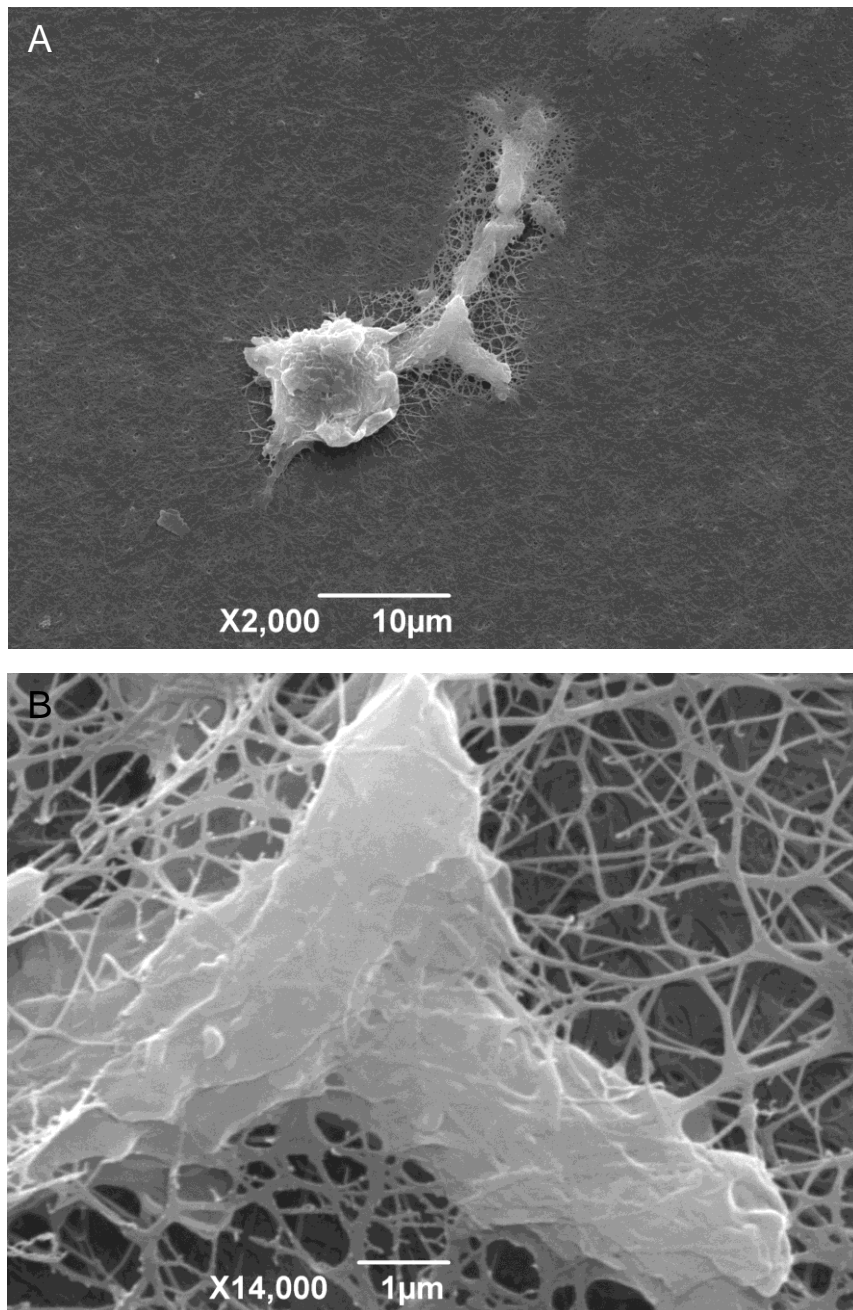


**Figura 23:** Morfologia e adesão de macrófagos cultivados sobre matriz de colágeno I. Microscopia eletrônica de varredura de Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ /poço) cultivados sobre matriz de colágeno I (modelo 3D). Após três horas de adesão dos macrófagos ao substrato, as culturas foram infectadas com formas metacíclicas do *T. cruzi* do clone Dm28c na proporção parasito:célula de 1:1. As imagens foram obtidas 48h após infecção. Nas figuras A e B observam-se o contato e o ancoramento do macrófago no modelo 3D.

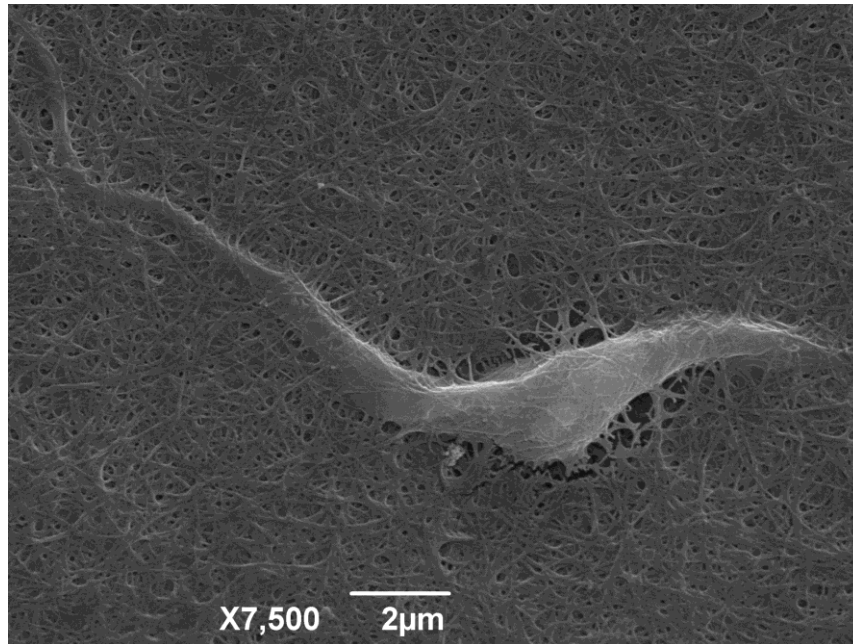




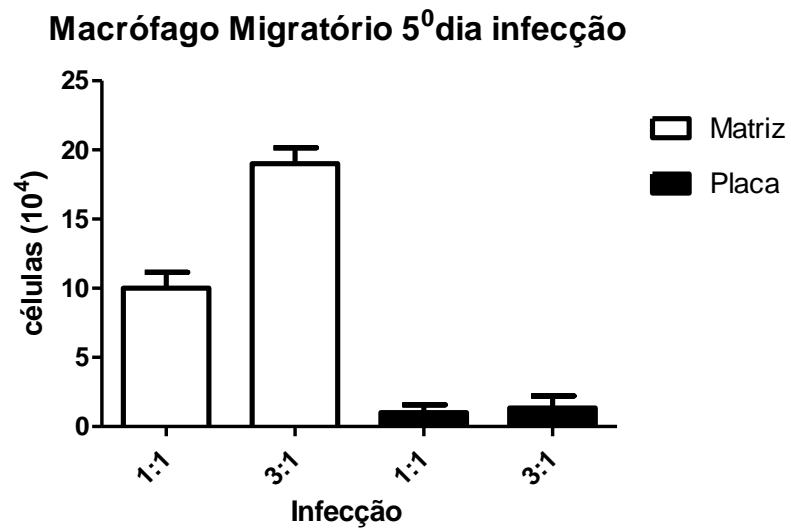
**Figura 24:** Adesão e morfologia de macrófagos cultivados sobre matriz ou gel de colágeno I. Microscopia eletrônica de varredura de Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ /poço) cultivados sobre matriz de colágeno I (modelo 3D). Após três horas de adesão dos macrófagos ao substrato, as culturas foram infectadas ON com formas metacíclicas do *T.cruzi* do clone Dm28c na proporção parasito:célula de 1:1. As imagens foram obtidas 48h após infecção. No detalhe das figuras A e C o contato entre as células e em B e D em maior magnitude.



**Figura 25:** Adesão e morfologia de macrófagos cultivados sobre matriz ou gel de colágeno I. Microscopia eletrônica de varredura de Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $6 \times 10^5$ /poço) cultivados sobre matriz de colágeno I (modelo 3D). Após três horas de adesão dos macrófagos ao substrato, as culturas foram infectadas ON com formas metacíclicas do *T. cruzi* do clone Dm28c na proporção parasito:célula de 1:1. As imagens foram obtidas 48h após infecção observamos macrófagos migratórios remodelando a malha para seu deslocamento (A) aumento de 200X. (B) aumento de 1400x.



**Figura 26:** Microscopia eletrônica de varredura de cultura de macrófagos infectados pelo *T.cruzi* do clone Dm28c mostrando uma forma tripomastigota liberada da célula e “penetrando” por entre a malha de Colágeno I. As imagens foram obtidas 48h após infecção.



**Figura 27:** gráfico da contagem de macrófago migratório após 48h pós-infecção.

## 6. DISCUSSÃO

A cultura celular em monocamada (2D) é caracterizada por permitir a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que a originou. A utilização desta técnica possibilitou a melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula permitindo importantes avanços científicos nos diferentes áreas de pesquisa. Entretanto, as repostas obtidas em cultura de células 2D nem sempre são totalmente satisfatórias uma vez que o comportamento das células em monocamadas quase sempre difere daquele observado *in vivo*, considerando-se a falta de interações célula-matriz ou célula-célula nestes tipo de protocolo experimental como limitação do método. A cultura de células em 3 dimensões (3D) derivou-se inicialmente da cultura de células em monocamadas. O diferencial da cultura 3D é permitir que as células explorem as 3 dimensões do espaço, aumentando assim as interações entre as células e com o ambiente. Então, a utilização de modelos 3D como suporte físico composto de polímeros sintéticos ou materiais naturais, como o colágeno, laminina, fibronectina, entre outros, serve como estrutura padrão que mimetiza as condições espaciais as quais as células estão sujeitas *in vivo*. (Jacob & Sudhakaran, 2001, Cukierman *et al.* 2001, Maltman & Przyborski, 2010). A utilização de culturas de células em modelos de 3D tem propiciado estudos de infecção com bactérias e vírus que refletem o processo de infecção natural. Esses modelos podem ser adaptados para o estudo de outros agentes infecciosos como por exemplo parasitas (Nickerson *et al.*, 2007).

Um possível fator que contribui para a modulação da atividade celular pela matriz é a forma da célula. Já foi demonstrado que as propriedades mecânicas da matriz extracelular regulam a organização do citoesqueleto de actina, determinantes para a forma e motilidade da célula. O processo de polimerização da actina é relevante para mudanças morfológicas dos macrófagos, *in vivo*, durante o extravasamento, migração e diferenciação destes.

Em condições naturais de infecção, provavelmente, os macrófagos constituem as primeiras células do hospedeiro vertebrado invadidas pelo *T.*

*cruzi*. O estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi* depende de uma série de eventos envolvendo interações entre moléculas do parasito e do hospedeiro (Yoshida, 2006). Esse processo tem sido extensivamente estudado *in vitro* com linhagens de células de mamíferos ou macrófagos peritoneais residentes em monocamadas aderidas em superfícies rígidas, como por exemplo, o poliestireno de placas de 24 poços tratadas para cultura de células (modelo 2D) (Silva-Filho & Menezes, 2004; Freire & Coelho-Sampaio, 2000).

No presente estudo, decidimos avaliar as alterações morfológicas dos macrófagos peritoneais residentes infectados pelo *T. cruzi* e a replicação do parasito em células cultivadas sobre matriz de Colágeno I no modelo 3D. Vale ressaltar que, num levantamento da literatura, não encontramos estudo semelhante ao nosso.

Utilizando a técnica de cultivo de macrófagos peritoneais residentes num substrato de matriz de colágeno I (modelo 3D) que cria uma camada mais espessa, demonstramos o aumento significativo do número de formas tripomastigotas nos sobrenadantes das culturas após sete e dez dias de incubação. Em contraste com os resultados obtidos pela utilização do sistema convencional de cultura quando os macrófagos foram cultivados diretamente nos poços das placas de 24 poços ou sobre o biofilme, modelos 2D.

Considerando que no caso dos macrófagos, a maior parte dos parasitos é interiorizada via mecanismo do tipo fagocítico, envolvendo polimerização de filamentos de actina necessária à formação de projeções de membrana, chamadas pseudópodos (Nogueira e Cohn, 1976; Rosestolato *et al.*, 2002, Barrias *et al.*, 2013), observamos, pela marcação da actina com foloidina-Alexa 488 e análise por microscopia confocal, que os macrófagos infectados e cultivados sobre matriz de COL I apresentavam prolongamentos e havia contato entre as células. O colágeno I pode estar induzindo uma reorganização no citoesqueleto de actina nos macrófagos infectados em nosso sistema, o que favoreceria a formação das projeções observadas e conseqüentemente facilitaria a infecção das células. É importante mencionar que a faloidina se liga somente aos filamentos de actina e que o *T. cruzi* não possui esses filamentos (De Souza, 2002).

No presente estudo confirmamos os resultados obtidos por microscopia confocal com a utilização da microscopia eletrônica de varredura, mostrando que os macrófagos cultivados e infectados pelo *T. cruzi* sobre matriz de COL I apresentavam-se espalhados, com prolongamentos finos, que havia contato célula-célula. Além dessas observações, também verificamos que os prolongamentos dessas células estavam “ancorados” na matriz e que havia migração dos macrófagos através do substrato de COL I. Não observamos as mesmas alterações morfológicas em monocamadas de macrófagos cultivados sobre lamínulas distribuídas em placas de placa de 24 poços ou quando as células foram cultivadas tendo o biofilme como substrato (resultados não mostrados).

O cultivo dos macrófagos sobre a matriz de colágeno favoreceu a formação de células migratórias (macrófagos migratórios). Este fenômeno foi observado nos macrófagos infectados pelo *T. cruzi*. Matrizes extracelulares criam barreiras físicas para a migração celular. No entanto, os macrófagos são capazes de atravessar a maioria, se não todos, os tecidos do corpo. Para alcançar os sítios tissulares, os macrófagos fazem a transmigração através da parede endotelial, em seguida ocorre a migração através de membranas basais e nos espaços intersticiais (Ley et al, 2007; Van Goethem et al, 2010). Embora a migração de macrófagos em duas dimensões tenha sido exaustivamente estudado (Doyle et al, 2009), o mecanismo envolvendo a migração em modelos 3D tem sido pouco explorado. O nosso modelo demonstra pela primeira vez a presença dessas células migratórias em um modelo de infecção por parasitas. Pelo fato de apresentarem um número maior de macrófagos migratórios nas culturas de macrófagos infectados sobre a matriz de colágeno I, estas células podem estar envolvidas na sinalização celular favorecendo a exacerbação da resposta imunitária. Os dados apresentados nesta dissertação sobre a presença dos macrófagos migratórios são preliminares, outros experimentos serão realizados futuramente, na tentativa de desvendar a importância destas células para a infecção. Por exemplo, a microscopia de transmissão para “tentar” encontrar amastigotas no interior da célula. Poderíamos também, avaliar a velocidade e/ou distância percorrida pelos macrófagos infectados e não infectados. Acreditamos que com este modelo de estudo, o papel dos

macrófagos podem contribuir para elucidar a interação dessas células com o agente infeccioso em outros modelos de infecção.

Desde os primeiros trabalhos sobre o processo de invasão e replicação do *T. cruzi* na célula do hospedeiro sabe-se que cerca de 2 horas após a invasão, ocorre a fragmentação da membrana do vacúolo parasitóforo e a liberação do parasito para o citoplasma (Burleigh e Andrews, 1998; Brener et al., 2000). Uma vez no citoplasma, as formas amastigotas permanecem quiescentes de 24 a 44 horas, posteriormente inicia-se o processo de divisão (Brener et al., 2000). O tempo de geração dos amastigotas pode variar de 8 a 15 horas, dependendo da cepa e a citocinese ocorre em 20 a 30 minutos (Hyde e Dvorak, 1973). O processo de transformação das formas amastigotas em tripomastigotas ocorre após 2-5 dias, sendo necessário para ocorrência da ruptura celular (Brener et al., 2000).

De forma intrigante, verificamos em nosso estudo que 48 horas após a infecção já foi possível quantificar formas tripomastigotas nos sobrenadantes de macrófagos cultivados e infectados sobre matriz de COL I. Esses parasitos não são remanescentes da infecção inicial dos macrófagos e que permaneceram aderidos a matriz de cológeno, uma vez que nos poços controle, em que distribuimos o COL I e as tripomastigotas metacíclicas diferenciadas *in vitro*, mas não adicionamos macrófagos, não observamos nenhuma forma evolutiva do *T. cruzi* nas culturas após a lavagem dos poços para remoção dos mesmos (resultados não mostrados). Uma hipótese para explicar a replicação e liberação precoce das formas tripomastigotas em macrófagos cultivados no substrato de COL I é que o contato da célula hospedeira com a matriz esteja modulando a atividade de moléculas chave do hospedeiro, como receptores de superfície, proteínas do citoesqueleto ou proteínas de sinalização celular. Outra possibilidade é que no sistema 3D, onde os macrófagos cultivados estão embebidos no substrato pode estar havendo a retenção de fatores secretados pelas células, o que contribuiria para o favorecimento da replicação intracelular do *T. cruzi*.

As formas tripomastigotas ao serem fagocitadas por macrófagos se diferenciam em formas amastigotas, tendo a sua sobrevivência determinada pelo estado de ativação do macrófago. Macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  são

capazes de destruir parcialmente os parasitos (Gutierrez *et al.*, 2009). Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram os estudos prévios, uma vez que a presença da matriz de COL I não alterou a ativação dos macrófagos pelo IFN- $\gamma$  e LPS, que foram capazes de controlar a replicação intracelular do *T. cruzi*.

Outro resultado surpreendente observado em nosso trabalho, foi a capacidade dos tripomastigotas liberados pelos macrófagos cultivados sobre a matriz de colágeno em infectar (ou tentar infectar) células não aderentes. Acreditamos que estas células sejam linfócitos peritoneais. É comum aparecer na cultura de macrófagos provenientes do peritônio células não aderentes que possuem a capacidade de replicação, mesmo sem estímulo. Já foi descrito que muitas dessas células são células B-1 (Ferreira *et al.*, 2003). A infecção de linfócitos por *T. cruzi* já foi descrita anteriormente por Velge e colaboradores (1989 e 1991). Neste trabalho foi observado a infecção de linfócitos T pelo *T. cruzi*. Os nossos dados sugerem que o cultivo de macrófagos infectados sobre a matriz de colágeno, favoreceu a liberação de formas infectivas com um perfil “mais agressivo”. Esse dado será analisado mais detalhadamente por nosso grupo em experiências *in vivo*. Nesse sentido, camundongos BALB/c (cepa susceptível) e C57BL/6 (cepa resistente) serão infectados com formas tripomastigotas liberadas por macrófagos infectados sobre a placa (2D) ou sobre a matriz de colágeno (3D), serão avaliados parâmetros como parasitemia, mortalidade e parasitismo tecidual.

O suporte físico (estrutura 3D) proporcionado pela camada de matriz de COL I utilizado em nosso sistema pode contribuir com informações relevantes para o melhor entendimento do processo de invasão do *T. cruzi*, onde interagem várias moléculas do parasita e da célula hospedeira, ativando vias de sinalização bidirecionais que promovem a internalização do parasito. Nessa primeira etapa do nosso trabalho estabelecemos a técnica 3D de cultivo de macrófagos sobre camada de matriz de COL I. Experimentos mais detalhados utilizando esse sistema são necessários para compreender os resultados obtidos até o momento.



## 7. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados do presente trabalho, podemos concluir que:

1. A adesão das células na superfície de matriz de Col I alterou a morfologia dos macrófagos;
2. A replicação acentuada do *T. cruzi* foi observada em macrófagos quando cultivados sobre matriz de COL I;
3. Foi constatado o contato célula-célula e o “ancoramento” dos macrófagos infectados na matriz de COL I
4. Houve produção de TGF- $\beta$  e prostanoídes nos macrófagos cultivados sobre matriz de COL I e infectados pelo *T. cruzi*;

Cultivo de macrófagos infectados pelo *T.cruzi* sobre matriz de colágeno I:

- a) Alterou a morfologia dos macrófagos infectados;
- b) Favoreceu a liberação de formas tripomastigotas 48h, 72h e 7 dias pós infecção;
- c) Induziu a produção de mediadores anti-inflamatórios (TGF- $\beta$ ) e prostanoídes totais;
- d) Favoreceu a diferenciação de macrófagos migratórios.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature*. 2003. 21;424:870-2.
- Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* 1996.64:1961-7.
- Barrias ES, de Carvalho TM, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front Immunol*. 2013 1;4:186
- Bissel M.J., Barcellos-Hoff M.H. The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? *Journal of Cell Science*. 1987. 8:327-343.
- Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Netto, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- Brodskyn C, Patricio J, Oliveira R, Lobo L, Arnholdt A, Mendonça-Previato L, Barral A, Barral-Netto M. Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infect Immun*. 2002 70(7):3736-43.
- Burleigh, B., Andrews, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Current in Microbiology*. 1998.1:461-465.
- Camargo MM1, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*. 1997 15;158:5890-901.
- Cardillo F, Falcão RP, Rossi MA, Mengel J. An age-related gamma delta T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol*. 1993; 23:2597-605.
- Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. [Geometric control of cell life and death](#). *Science*. 1997 30;276:1425-8.
- Conteras, V. T., Salles, J. M., Thomas, M., Morel, C. M., Goldenberg, S. In Vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitology*. 1985. 16;3:315-27.
- Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39:113-7.

- Cruvinel Wde M, Mesquita D Jr, Araújo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, Andrade LE. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Trends Cell Biol.* 2003;13(7):366-75.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, R. D., Yamada, M.K. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension, *Science.* 2001. 294:1708-1712.
- De Souza, W. *Current Pharmaceutical Drugs.* 2002. 8:211-231.
- Dias JC, Schofield CJ. [The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative](#). *Rev Soc Bras Med Trop.* 1998;31(4):373-83.
- Doyle A. D, Wang F. W, Matsumoto K, Yamada K. M. One-Dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration, *Journal Biol.* 2009. 23;184:481-90.
- Eastwood M, McGrouther DA., *et al.* Fibroblast responses to mechanical forces. *Proc Inst Mech Eng,* 1998. 212:85-92.
- Engler AJ, Sen S., *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell,* 2006. 126:677-89.
- Ferreira K. S, Almeida S. R, Ribeiro C. H, Mariano M, Lopes J. D. Modulation of proliferation, differentiation and cytokine secretion of murine B-1b cells by proteins of the extracellular matrix. *Immunol Lett.* 2003. 3;86(1):15-21.
- FIOCRUZ. Site consultado: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=119>. Data de consulta: 10 de fevereiro de 2014.
- Folkman, J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature.* 1978. 273:345-9.
- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010 15;123:4195-200.
- Freire E, Coelho-Sampaio T. Self-assembly of Laminin Induced by Acidic pH. *The Journal of Biological Chemistry,* 2000. 275:817-822.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* 1992; 22(10):2501-6.
- Girton TS, Dubey N, Tranquillo RT. Magnetic-induced alignment of collagen fibrils in tissue equivalents. *Methods Mol Med.* 1999;18:67-73.
- Gordon S. [Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation](#). *Immunol Lett.* 1999; 65(1-2):5-8.

- Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends in Cell Biology* 2003. 13:264-269.
- Guidry, C., Grinnell, F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J Cell Sci.* 1985. 79:67-81.
- Gutiérrez, F. R. S, Guedes P. M. M, Gazzinelli R. T & Silva J. S. The role parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease. *Parasite Immunology*, 2009. 31:673-685.
- Hey KB, Lachs CM, *et al.* Crosslinked fibrous collagen for use as a dermal implant: control of the cytotoxic effects of glutaraldehyde and dimethylsuberimidate. *Biotechnol Appl Biochem*, 1990. 12:85-93.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *Faseb J*, 2006. 20:811-27.
- Kanbara H, Uemura H., Nakazawa S., Nussenzweig V. Effect of low pH on transformation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote. *Japanese Journal of Parasitology.* 1990. 39:226-228.
- Lee, Y.J. and Streuli, C.H. (1999) Extracellular matrix selectively modulates the response of mammary epithelial cells to different soluble signaling ligands. *Journal of Biological Chemistry*. [Immunology](#). 1999 97(4):679-85.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007. 7(9):678-89.
- Li E, Yang WG, Zhang T, Stanley JR SL Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effects on amebic pathogenesis. *Infection and immunity.* 1995. 63:4150-4153.
- Lopes MF, Cunha JM, Bezerra FL, Gonzalez MS, Gomes JE, Lapa e Silva JR, Garcia ES, Dos Reis GA. [Trypanosoma cruzi: both chemically induced and triatomine-derived metacyclic trypomastigotes cause the same immunological disturbances in the infected mammalian host.](#) *Exp parasitol.* 1995; 80(2):194-204.
- Maltman D. J, Przyborski, S. A. Developments in three-dimensional cell culture technology aimed at improving the accuracy of in vitro analyses. *Biochem Soc Trans*, 2010. 38(4):1072-1075.
- Martin CJ, Peters KN, Behar SM. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 17C:17-23.
- Matthias P. Lutolf, Penney M. Gilbert, Helen M. Blau. Designing materials to direct stem-cell fate, *Nature.* 2009. 26;462: 433–441.
- Minor RR. Collagen metabolism: a comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *Am J Pathol.* 1980. 98(1):225-80.

- Miron-Mendoza M, Koppaka V, Zhou C, Petroll W. M. Techniques for assessing 3-D cell-matrix mechanical interactions in vitro and in vivo. *Exp cell Res.* 2013 1; 319:2470-2480.
- Moncayo, A. Progress towards the elimination of Chagas disease in Latin America. *World Health Stat Q*, 1997. 50:3-4: 195-8.
- Myllyharju J, Kivirikko KI, Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004. 20:33–43.
- Nickerson C. A, Richter E. G, Ott C. M. Studying host-pathogen interactions in 3-D: organotypic models for infectious disease and drug development. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007. 2:26-31.
- Nogueira N, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *The Journal of experimental medicine.* 1976. 1:1402-1420.
- Ortega N, Werb Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* 2002. 115: 4201–4214.
- Rev Bras Reumatol.* 2010; 50(4):434-61.
- Rhee S, Grinnell, F. Fibroblast mechanics in 3D collagen matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 2007. 59:1299-305.
- Roberts AI, Brolin RE, Ebert EC. Integrin alpha1beta1 (VLA-1) mediates adhesion of activated intraepithelial lymphocytes to collagen. *Immunology.* 1999. 97(4):679-85.
- Roeder BA, Kokini K, Sturgis JE, Robinson JP, Voytik-Harbin SL. Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *J Biomech Eng.* 2002. 124: 214-22.
- Romano PS, Cueto JA, Casassa AF, Vanrell MC, Gottlieb RA, Colombo MI. [Molecular and cellular mechanisms involved in the Trypanosoma cruzi/host cell interplay.](#) *IUBMB Life.* 2012 64:387-96.
- Rosestolato CT, Dutra Jda M, De Souza W, de Carvalho TM. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct.* 2002; 27(2):91-8.
- Saito H, Murabayashi S. Characterization of alkali-treated collagen gels prepared by different crosslinkers. *J Mater Sci Mater Med.* 2007. 19:1297-305.
- Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009. 104, 1:246-51.
- Schenk S, Quaranta V. Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix

- Scott A, Khan KM, Duronio V, Hart DA. Mechanotransduction in human bone: in vitro cellular physiology that underpins bone changes with exercise. *Sports Med.* 2008; 38(2):139-60.
- Silva-Filho FC, Menezes GC. Osteoblasts attachment and adhesion: how bone cells fit fibronectin-coated surfaces. *Materials Science and Engineering.* 2004. 24: 637-641.
- Steindel, M., Dias, J.C & Romanha, A.J., Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. *Ciência Hoje,* 2005. 37:32-38.
- Stoizner P, Pfaller K, Stossel H; Romani N. A close-up view of migration Langerhans cells in the skin. *J. Invest Dermatol* 2002. 118:117-125.
- Tomlinson, S. et al. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology,* vol. 110 (Pt 5), p. 547-54, Jun 1995.
- Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Gabec V. Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J Immunol.* 2010. 15; 184:1049-1061.
- Velge P, Kusnierz J. P, Ouaiissi A, Marty B, Pham B. N, Capron A. *Trypanosoma cruzi*: Infection of T lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1991. 21:2145-2152.
- Velge P, Ouaiissi A, Kusnierz JP, Capron A. Infection of T lymphocytes by *Trypanosoma cruzi*. Possible role of CD3 and HLA-DR. *C R Acad Sci III.* 1989; 309(4):93-9.
- Weadock K, Olson RM. Evaluation of collagen crosslinking techniques. *Biomater Med Devices Artif Organs.* 1983. 11:293-318.
- WHO – World Health Organization. Chagas Disease. Site consultado: [http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/). Data de consulta: 10 de fevereiro de 2014.
- WOOD, G. C. E M. K. KEECH. The formation of fibrils from collagen solutions. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. *Biochem J.* 1960. 75:588-98.
- Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int.* 2008; 57(2):105-9.