

**CAMILA BÁRBARA CANTALUPO LIMA**

Estudo da invasão de hepatócitos de rato por  
*Shigella flexneri*: análise da influência da hipóxia  
sobre a injúria celular

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias  
Orientador: Dr. Dahir Ramos de Andrade Júnior

**SÃO PAULO**

**2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Camila Bárbara Cantalupo

Estudo da invasão de hepatócitos de rato por *Shigella flexneri* : análise da influência da hipóxia sobre a injúria celular / Camila Bárbara Cantalupo Lima. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dahir Ramos de Andrade Júnior.

Descritores: 1.*Shigella flexneri* 2.Hepatócitos 3.Hipóxia 4.Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia 5.Fator de necrose tumoral alfa 6.Apoptose 7.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-367/11

Aos meus avôs maternos *Adélia do Céu Cantalupo* e *Michele Rosário Cantalupo*, por terem me educado no caminho da bondade e honestidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Dahir Ramos de Andrade Jr., por confiar no meu trabalho, por ter me aceitado como aluna e por toda a atenção, apoio e amizade dedicada em todos os momentos.

A Dra. Sânia Alves dos Santos, pelo carinho, dedicação, amizade e toda a ajuda imprescindível na realização deste trabalho.

A minha orientadora de iniciação científica, Profa. Dra. Selma Giorgio, do Departamento de Biologia Animal da UNICAMP, por ser a responsável pela minha iniciação no mundo acadêmico e por todos os exemplos e ensinamentos que levarei para toda a vida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa e bolsa de mestrado para a execução deste trabalho.

Aos meus pais, Maria Antonieta e José, pelo amor e apoio em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia (LIM-54) do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP: Dra. Silvia Figueiredo Costa, Mauro, Inneke, Andrea e Norival, pelo apoio constante.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas e a bióloga Ana Lúcia Garippo, pela concessão ao uso, auxílio valioso e dedicação no uso do microscópio confocal (Núcleo de Microscopia Confocal do HCFMUSP).

Ao Prof. Dr. Marcelo Britto Passos Amato e a Susimeire Gomes do Laboratório de Pneumologia (LIM-09), pela concessão ao uso e constante auxílio no aparelho medidor de gases.

A Profa. Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda pela concessão ao uso do espectrofotômetro.

Ao programa de pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da FMUSP.

A todos os colegas e funcionários da FMUSP e UNICAMP que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado e que contribuíram para a minha formação acadêmica ao longo desses anos.

Ao grande colega Prof. Dr. Wagner Welber Arrais-Silva, da UFMT, por sempre me apoiar e ser para mim um exemplo de pesquisador.

Aos animais cedidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP, sem os quais não poderíamos ter desenvolvido este modelo de estudo e que foram sempre tratados com respeito e ética.

A Deus, por sempre me mostrar o melhor caminho e nunca fechar uma porta sem abrir outra em minha vida.

Muito Obrigada!

*A sorte favorece a mente bem preparada.*

Louis Pasteur

# SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Invasão de hepatócitos por <i>S. flexneri</i> .....	3
1.2. Papel da hipóxia .....	4
1.3. TNF- $\alpha$ e morte celular por apoptose .....	7
2. OBJETIVOS .....	10
3. MÉTODOS .....	11
3.1. Cultura primária de hepatócitos de rato .....	11
3.2. Obtenção da hipóxia nas culturas de hepatócitos .....	13
3.3. Infecção de hepatócitos de rato por <i>S. flexneri</i> e taxa de invasão .....	14
3.4. Viabilidade celular e análise da morfologia em microscópio óptico.....	15
3.5. Detecção de TNF- $\alpha$ liberado pelo método ELISA .....	17
3.6. Detecção da produção e liberação de DHL .....	19
3.7. Quantificação da taxa de morte celular por apoptose .....	20
3.8. Detecção da expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ .....	22



3.9. Análise Estatística .....	23
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Padronização do microambiente hipóxico .....	24
4.1.1. Retirada parcial de oxigênio do meio de cultura .....	24
4.1.2. Obtenção de microambiente hipóxico nas culturas de hepatócitos .....	25
4.2. Invasão de hepatócitos de rato por <i>S. flexneri</i> nas condições de normóxia e hipóxia .....	26
4.3. Viabilidade dos hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção .....	28
4.4. Morfologia de hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção .....	30
4.5. Liberação de TNF- $\alpha$ por hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção .....	35
4.6. Produção e liberação de DHL por hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção .....	37
4.7. Quantificação da morte de hepatócitos de rato por apoptose nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção .....	39

4.8. Expressão de HIF-1 $\alpha$ por hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção .....	41
5. DISCUSSÃO .....	44
6. CONCLUSÕES .....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
APÊNDICE 1 – RESULTADOS COMPLEMENTARES – DHL	
APÊNDICE 2 – TABELA ESTATÍSTICA	

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Recuperação intracelular de *S. flexneri* em hepatócitos de rato nas condições de normóxia e hipóxia por 24 horas (6.5% O<sub>2</sub>) nas MOIs 5, 50 e 500 ..... 27
- Figura 2 - Viabilidade de hepatócitos de rato dimensionada pela coloração por Trypan Blue nas situações de normóxia, hipóxia por 24 horas, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* em diferentes MOIs (5, 50 e 500). Os grupos N (MOI5), N (MOI50) e N (MOI500) representam os grupos de hepatócitos em normóxia e infectados com *S. flexneri*; os grupos H (MOI5), H (MOI50) e H (MOI500) representam os grupos de hepatócitos em hipóxia por 24 horas, posteriormente infectados com *S. flexneri* ..... 29
- Figura 3 - Hepatócitos de rato corados com hematoxilina e eosina. A: condição de normóxia, hepatócitos com 7 dias de cultivo em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar (contendo 21% de O<sub>2</sub>) à 37 °C; B: condição de hipóxia, hepatócitos em câmara incubadora preenchida com N<sub>2</sub> por 24 horas à 37 °C. (400x) ..... 31
- Figura 4 - Hepatócitos de rato em condição normóxica infectados por *S. flexneri* e corados com hematoxilina e eosina. MOI 5 (A), MOI 50 (B) e MOI 500 (C). (400x) ..... 32

Figura 5 -	Hepatócitos de rato submetidos à hipóxia e infectados com <i>S. flexneri</i> . MOI 5 (A), MOI 50 (B) e MOI 500 (C). (400x) .....	33
Figura 6 -	Hepatócitos de rato infectados por <i>S. flexneri</i> e corados com hematoxilina e eosina nas situações de normóxia: MOI 5 (A), MOI 50 (B), MOI 500 (C); e hipóxia: MOI 5 (D), MOI 50 (E) e MOI 500 (F). (1000x)	34
Figura 7 -	Liberação de TNF- $\alpha$ em sobrenadantes de culturas de hepatócitos nas situações de normóxia (N), hipóxia (H), normóxia + infecção (N+MOI) e hipóxia + infecção (H+MOI) por <i>S. flexneri</i> nas MOIs: 5, 50 e 500 .....	36
Figura 8 -	Porcentagem de citotoxicidade (produção e liberação de DHL) em hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por <i>S. flexneri</i> na multiplicidade de infecção (MOI): 5, 50 e 500 .....	38
Figura 9 -	Porcentagem de apoptose em hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção (MOI 5, 50 e 500) .....	40
Figura 10 -	Expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ em hepatócitos de rato nas condições de normóxia (A) e normóxia + infecção MOI 5 (B), 50 (C) e 500 (D). Os	

	núcleos celulares estão corados com DAPI (A1, B1, C1 e D1) .....	42
Figura 11 -	Expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ em hepatócitos de rato nas condições de hipóxia (A) e hipóxia + infecção MOI 5 (B), 50 (C) e 500 (D). Os núcleos celulares estão corados com DAPI (A1, B1, C1 e D1) .....	43

## TABELAS

Tabela 1 -	Pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) no meio de cultura de hepatócitos Williams' E nas condições de normóxia e hipóxia (após borbulhamento de $N_2$ por 1 hora com agitação a cada 5 minutos) .....	24
Tabela 2 -	Pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) no meio de cultura de hepatócitos Williams' E nas condições de normóxia em contato com os hepatócitos por 24 horas e hipóxia (após borbulhamento de $N_2$ por 1 hora com agitação a cada 5 minutos), com posterior incubação em câmara hipóxica por 24 horas .....	25
Tabela 3 -	Recuperação intracelular de <i>S. flexneri</i> em hepatócitos de rato nas condições de normóxia e hipóxia por 24 horas (6.5% $O_2$ ) nas MOIs 5, 50 e 500 .....	28
Tabela 4 -	Viabilidade de hepatócitos de rato dimensionada pela coloração por Trypan Blue nas situações de normóxia, hipóxia por 24 horas, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por <i>S. flexneri</i> em diferentes MOIs (5, 50 e 500) .....	30
Tabela 5 -	Liberação de TNF- $\alpha$ por hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia por 24 horas, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por <i>S. flexneri</i> em diferentes MOIs (5, 50 e 500) .....	37

Tabela 6 - Porcentagem de citotoxicidade (produção e liberação de DHL) em hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* na multiplicidade de infecção (MOI): 5, 50 e 500 ..... 39

Tabela 7 - Porcentagem de hepatócitos de rato em apoptose nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* na multiplicidade de infecção (MOI): 5, 50 e 500 ..... 41

## RESUMO

Lima, Camila Bárbara Cantalupo. *Estudo da invasão de hepatócitos de rato por Shigella flexneri: análise da influência da hipóxia sobre a injúria celular*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

O presente estudo avaliou a capacidade de invasão de hepatócitos de rato por *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) nas condições de normóxia e hipóxia. O estudo do microambiente de hipóxia tem grande importância, por estar presente em muitas doenças hepáticas, além de aumentar a translocação quando presente no lúmen intestinal. Bactérias invasivas como *S. flexneri* podem romper a barreira intestinal e chegar ao fígado através da circulação portal. O efeito da invasão bacteriana das células hepáticas é pouco conhecido. Neste trabalho buscamos pesquisar as alterações morfológicas e funcionais de hepatócitos de rato após infecção por *S. flexneri* na presença e na ausência de hipóxia. Para esta finalidade foram utilizados hepatócitos de rato cultivados pela técnica de cultura primária. Vários parâmetros foram analisados, tais como: taxa de invasão celular pela bactéria, quantificação da produção e liberação de DHL, produção de TNF- $\alpha$ , taxa de morte celular por apoptose e a expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ . Os resultados mostraram que a metodologia empregada para a obtenção do microambiente hipóxico foi satisfatória, com redução de 70% da pO<sub>2</sub> inicial (atingindo 43.2 mmHg *in vitro* ou 6.5% O<sub>2</sub>). A invasão de hepatócitos de rato



por *S. flexneri* foi menor nas células previamente expostas à hipóxia quando comparada com a invasão das células cultivadas em normóxia. A viabilidade dos hepatócitos não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais, variando entre 74 e 86%. A liberação de TNF- $\alpha$  nas situações de normóxia e hipóxia foi similar, embora as células infectadas em normóxia tenham aumentado a liberação desta citocina. Na condição de hipóxia + infecção a liberação de TNF- $\alpha$  foi menor do que na condição de normóxia + infecção, porém ambos os grupos produziram aumento significativo da citocina em relação aos controles normóxicos e hipóxicos. Este resultado sugere que a presença da bactéria no interior das células aumenta significativamente a liberação de TNF- $\alpha$  pelos hepatócitos. A produção de DHL também foi maior de forma significativa no grupo hipóxico em relação ao grupo normóxico, porém não apresentou alteração nos grupos infectados por *S. flexneri* após uma hora. As taxas de apoptose aumentaram nos grupos hipóxia e nos grupos infectados com *S. flexneri* de maneira similar, variando entre 24 e 31%, quando comparados aos grupos controle em normóxia. A expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  ocorreu nos grupos: hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção, evidenciando que a infecção por *S. flexneri* induz a expressão deste fator. Em seu conjunto, nossos resultados buscam contribuir para o maior conhecimento da interação entre *S. flexneri* e hepatócitos em condição de hipóxia e normóxia. Tal conhecimento poderá ser útil na construção de futuras estratégias para auxiliar no combate a esta importante bactéria invasiva, principalmente nos casos de septicemia.

Descritores: *Shigella flexneri*; Hepatócitos; Hipóxia; Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia; Fator de necrose tumoral alfa; Apoptose; Ratos Wistar

## ABSTRACT

Lima, Camila Bárbara Cantalupo. *Study of rat hepatocytes invasion by Shigella flexneri: analysis of hypoxia influence on cellular injury*. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

This study evaluated the invasiveness of rat hepatocytes by *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) in normoxia and hypoxia conditions. The study of hypoxia microenvironment is of great importance, since hypoxia is present in many liver diseases and increases bacterial translocation when present in intestinal lumen. Invasive bacteria such as *S. flexneri* can disrupt the intestinal barrier and reach the liver through portal circulation. The effect of bacterial invasion in liver cells is poorly understood. In this study we investigated the morphological and functional changes of rat hepatocytes after infection with *S. flexneri* in the presence and absence of hypoxia. For this purpose we used primary cultures of rat hepatocytes. Several parameters were analyzed, such as: bacterial invasion cell rate, quantification of LDH production and release, TNF- $\alpha$  production, cell death rate by apoptosis and expression of the transcription factor HIF-1 $\alpha$ . The results showed that the methodology used to obtain the hypoxic microenvironment was satisfactory, with 70% reduction of initial pO<sub>2</sub> (to 43.2 mmHg *in vitro* or 6.5% O<sub>2</sub>). The invasion of rat hepatocytes by *S. flexneri* was lower in cells previously exposed to hypoxia compared with the invasion of cells grown in normoxia. The viability of

hepatocytes showed no significant differences between experimental groups, ranging between 74% and 86%. The release of TNF- $\alpha$  in situations of normoxia and hypoxia was similar, although the infected cells in normoxia have increased the release levels of this cytokine. In hypoxia + infection condition the release of TNF- $\alpha$  was lower than normoxia + infection condition, but both groups produced a significant increase in cytokine release when compared to normoxic and hypoxic controls. This result suggests that the presence of bacteria inside the cells significantly increases the release of TNF- $\alpha$  by hepatocytes. DHL production was also significantly greater in the hypoxic group compared to the normoxic group, but had no change in the groups infected with *S. flexneri* after an hour. The apoptosis rates increased in hypoxia and infected groups in a similar way, varying between 24% and 31% when compared with control group in normoxia. The expression of HIF-1 $\alpha$  transcription factor occurred in hypoxia, normoxia + infection and hypoxia + infection groups, indicating that infection with *S. flexneri* induces the expression of this factor. Overall, our results sought to contribute to a greater understanding of the interaction between *S. flexneri* and hepatocytes under hypoxia and normoxia conditions. Such knowledge may be useful in building future strategies to assist in combating these major invasive bacteria.

Descriptors: *Shigella flexneri*; Hypoxia; Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; Tumor necrosis factor alpha, Apoptosis; Rats, Wistar

## INTRODUÇÃO

*Shigella flexneri* (*S. flexneri*) é uma enterobactéria gram-negativa intracelular facultativa, não formadora de esporos e de formato bacilar, agente causador da disenteria bacilar em humanos (Sansone et al., 2001).

Calcula-se que mais de um milhão de mortes ocorram todos os anos devido a infecções com *Shigella* spp., sendo as vítimas na sua maioria crianças de países em desenvolvimento (Philpott et al., 2000).

Estudo realizado no continente asiático relatou o isolamento de *Shigella* spp. em 5% de todos os casos de diarreia aguda diagnosticados entre 2000 e 2004, sendo *S. flexneri* a espécie mais isolada (68%) (von Seidlein et al., 2006). Em estudo brasileiro, *S. flexneri* foi a etiologia bacteriana predominante nos casos de diarreia aguda em crianças, atingindo 11.4% dos casos e 7.8% do total (Souza et al., 2002).

Pertencem ao gênero *Shigella* quatro espécies: *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei* e *Shigella boydii*, com 43 sorotipos distintos (Yang et al., 2006). Aproximadamente 60% das amostras de *Shigella* spp. isoladas de pacientes com disenteria bacilar em todo o mundo correspondem à espécie *S. flexneri*, sendo o sorotipo 2a o mais frequente (Kotloff et al., 1999).

A transmissão de *S. flexneri* ocorre por ingestão de água, alimentos contaminados, ou ainda pelo contato direto entre pessoas. Essa bactéria usualmente apresenta resistência a vários antimicrobianos (von Seidlein et al., 2006), sendo os antibióticos mais frequentemente utilizados para o seu

tratamento as quinolonas, os derivados de cefalosporina e a azitromicina (Niyogi, 2005).

A doença provocada por *S. flexneri*, conhecida por disenteria bacilar ou shigelose, pode se apresentar com diferentes formas clínicas, que variam desde uma diarreia aquosa de curta duração, até diarreia intensa e duradoura com sinais evidentes de agressão da mucosa colônica, como presença de sangue e muco nas fezes. Os sintomas mais comuns são: febre, dores abdominais e diarreia sanguinolenta com fezes mucopurulentas.

Existem fatores que resultam em um agravamento da doença, tais como: hipoglicemia aguda, síndrome hemolítico-urêmica, perfurações intestinais, peritonite e septicemia (Sansone et al., 2001, Jennison et al., 2004), e também fatores que comprometem o resultado do tratamento, como a resistência a alguns antibióticos em áreas endêmicas (von Seidlein et al., 2006).

O microambiente hipóxico pode ocorrer em algumas dessas situações clínicas, mormente nas complicações intestinais e na septicemia (Schumacker et al., 1987, Taylor et al., 2007).

Além da importância como agente causador de diarreia aguda em humanos, *S. flexneri* é um patógeno muito utilizado como modelo de estudo de invasão celular, por sua característica peculiar de possuir baixa dose infectante tanto em modelos de estudo "in vitro" como "in vivo" (Levine et al., 1973, Dupont et al., 1989).

### 1.1. Invasão de hepatócitos por *S. flexneri*

*S. flexneri*, como as demais espécies do gênero *Shigella*, é internalizada nas células da mucosa intestinal colônica através do “ruffling” de membrana e da macropinocitose. A sua entrada na célula é relacionada ao sistema de secreção do tipo III, pelo qual a bactéria injeta proteínas efetoras (Ipa) através da membrana celular no citoplasma da célula hospedeira, induzindo profundos rearranjos locais no citoesqueleto que permitirão a sua internalização (Gálan et al., 1999, Phalipon et al., 2007). O reconhecimento é mediado por receptores de peptidoglicanos Nod-1 e Nod-2, que ativam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Girardin et al., 2003, Body-Malapel et al., 2008).

Inicialmente a bactéria permanece em um vacúolo dentro da célula, de onde rapidamente escapa para o citoplasma através de lise. Uma vez no citoplasma, ela cresce e se divide por fissão binária, dando origem a novas bactérias que ficam revestidas com filamentos de actina, formando uma cauda em um dos pólos. Essa polimerização da actina permite a propulsão da bactéria no citoplasma com velocidades que chegam a 0.4  $\mu$ m/seg (Zeile et al., 1996). Quando atinge a membrana plasmática da célula, a bactéria forma uma longa protrusão para a célula vizinha, sendo assim internalizada e iniciando um novo ciclo de infecção. Esse processo permite que *S. flexneri* se desloque de célula em célula sem ter contato com o meio externo (Goosney et al., 1999).

O contato de *S. flexneri* com a mucosa colônica provoca intensa resposta inflamatória, que pode levar à morte celular das células epiteliais dessa região por necrose e apoptose, causando lesões com formação de abscessos (Perdomo et al., 1994).

Devido à degeneração do epitélio, as bactérias podem alcançar a corrente sanguínea, atingindo preferencialmente o fígado, com formação de microgranulomas e morte de macrófagos por apoptose (Martino et al., 2005).

Além disso, as células M das placas de Peyer e macrófagos do tecido linfóide intestinal podem internalizar bactérias e facilitar o transporte trans-epitelial. Este fenômeno é conhecido como translocação bacteriana (Walker & Owen, 1990, Body-Malapel et al., 2008).

Os hepatócitos apresentam papel potencial em iniciar ou amplificar a resposta inflamatória aguda no fígado, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, em papel complementar ao exercido pelas células de Kupffer e células endoteliais (Rowell et al., 1997). Contudo, os efeitos provocados pela invasão dos hepatócitos por *S. flexneri* são pouco conhecidos.

## **1.2. Papel da hipóxia**

A queda acentuada da pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) é observada em várias situações clínicas, tais como: insuficiências cardíaca e pulmonar, septicemia e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Ebert, 2006, Lenz



et al., 2007). Especificamente em relação ao fígado, as neoplasias, as hepatites fulminantes, a insuficiência cardíaca, a síndrome de Budd-Chiari entre outros, podem gerar um microambiente hipóxico causado pela proliferação celular descontrolada, pela congestão hepática e pela perfusão deficiente, condições que dificultam a difusão do oxigênio (Dunn et al., 1973, Henrion et al., 2007, Wu et al., 2007).

Há evidências que a membrana intestinal é especialmente sensível a injúrias isquêmicas, e este seria um fator envolvido na translocação bacteriana. Desta forma, nos transplantes hepáticos, por exemplo, onde é realizado o clampeamento da veia porta por 60 a 90 minutos, ocorreria a isquemia intestinal e o conseqüente aumento da translocação bacteriana (Abdala et al., 2007).

Além disso, o fígado realiza o chamado “clearance” hepático, que consiste na eliminação de bactérias e toxinas, mediada pela atividade fagocítica das células de Kupffer. Casos de choque hemorrágico diminuem o “clearance” hepático, dificultando a eliminação de bactérias e toxinas que porventura tenham alcançado o fígado (Kondo et al., 1996, Strassburg, 2003).

O microambiente hipóxico, por sua vez, pode interpor resistência ao tratamento de doenças e à resposta imune (Murdoch et al., 2005, Hoogsteen et al., 2007), o que torna de grande interesse a análise das mudanças funcionais e estruturais das células nesse microambiente. A hipóxia tecidual também pode ocorrer em processos infecciosos, devido à proliferação bacteriana e ao aumento de células inflamatórias (Lahat et al., 2008).

O fator de transcrição HIF (Hypoxia Inducible Factor) é uma proteína heterodimérica composta das subunidades  $1\alpha$  e  $1\beta$ . Em condições de normóxia a subunidade  $1\alpha$  é degradada, enquanto que em hipóxia a subunidade  $1\alpha$  se liga com a subunidade  $1\beta$  formando uma proteína estável (Lee et al., 2004). A degradação de HIF- $1\alpha$  em condições normóxicas é mediada pela sua hidroxilação por enzimas sensíveis ao oxigênio e posterior marcação com a proteína ubiquitina, sinalizando para a sua degradação molecular proteossomal. Em condições hipóxicas, o HIF- $1\alpha$  é translocado para o núcleo celular aonde se liga à subunidade  $1\beta$  com o recrutamento da proteína p300/CBP. Esse complexo se liga a elementos genômicos que possuem a seqüência consenso ACGTG e ativam a transcrição de genes responsivos à hipóxia (Murdoch & Lewis, 2005).

O HIF atua como um mediador de respostas fisiológicas à hipóxia, ativando a transcrição de genes relacionados com a proliferação e sobrevivência celular, metabolismo do ferro, metabolismo energético e protéico, angiogênese, resistência a drogas, entre outros (Semenza, 2003).

Desta forma o HIF é tido como um promissor alvo de tratamentos moleculares (Semenza, 2000, Melillo, 2007, Semenza, 2007). Estudos recentes demonstraram que o HIF- $1\alpha$  não é expresso somente em situações de hipóxia, mas pode aparecer também em processos infecciosos (Kempf et al., 2005, Degrossoli et al., 2007). O significado da expressão do HIF- $1\alpha$  nas infecções em geral ainda é pouco conhecido. Por este motivo procuramos, neste trabalho, avaliar a expressão de HIF- $1\alpha$  em hepatócitos de rato

cultivados em condições de normóxia, hipóxia e após invasão com *S. flexneri*.

A lactato desidrogenase (DHL) é uma isoenzima citoplasmática que catalisa a conversão reversível do piruvato para lactato, utilizando o cofator NAD. Sua presença no sobrenadante de culturas celulares reflete a perda da integridade da membrana plasmática, e o aumento da porcentagem liberada de DHL está relacionado com o grau de injúria das células (Brooks et al., 1999, Andrade Jr. et al, 2009). Estudo recente demonstrou que há uma correlação entre a expressão de DHL e HIF-1 $\alpha$  em tumores (Kolev et al., 2008), sugerindo que ambos apresentam um papel importante no desenvolvimento e na progressão de várias doenças. A liberação de DHL pelas células é observada tanto na presença de infecção bacteriana, quanto em microambientes de hipóxia (Fernandez-Prada et al., 1997, Ma et al., 2002, Andrade Jr. et al., 2009). Entretanto, a influência destes dois fatores agressores em conjunto (infecção bacteriana e hipóxia) sobre a produção e liberação de DHL pelas células é pouco estudada.

### **1.3. TNF- $\alpha$ e morte celular por apoptose**

TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por diferentes tipos de células, sendo um importante mediador em várias condições celulares, como por exemplo, no processo de morte celular programada (apoptose)

(Cosgrove et al., 2008). Processos infecciosos são potenciais estimuladores de TNF- $\alpha$ , e a hipóxia pode atuar sinergicamente elevando os níveis de produção da citocina (Ndengele et al., 2000). Os hepatócitos produzem TNF- $\alpha$  em várias condições: quando expostos a bactérias, no processo de regeneração celular e quando agredidos pela hipóxia (Bradham et al., 1998, Santos et al., 2005, Andrade Jr. et al., 2009).

Os enterócitos infectados por *S. flexneri* produzem TNF- $\alpha$  e outras citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-4 e IL-10 (Raqib et al., 1995). A produção de citocinas em hepatócitos invadidos por *S. flexneri*, bem como a influência da hipóxia nesse processo, são fenômenos pouco estudados.

A morte celular por apoptose mediada por TNF- $\alpha$  parece fazer parte do desenvolvimento embrionário normal (Wride & Sanders, 1995). É um processo bioquimicamente conservado de morte, com características morfológicas particulares (Steller, 1995). A apoptose é caracterizada por encolhimento da célula, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA internucleosomal. Esta forma de morte celular pode ocorrer como fenômeno citotóxico mediado por TNF- $\alpha$ , ocorrendo através da via sinalizadora TNFR-1 (Grell et al., 1999).

Assim como a produção de TNF- $\alpha$ , a apoptose também pode ser induzida por processos infecciosos e pelo ambiente hipóxico (Crenesse et al., 2000, Dockrell et al., 2001). Trabalhos demonstraram que a expressão de HIF-1 $\alpha$  protege alguns tipos celulares da apoptose, de maneira provavelmente específica para cada célula (Akakura et al., 2001, Piret et al., 2002).

Neste trabalho, como já referido, pretendemos avaliar a expressão de HIF-1 $\alpha$  pelos hepatócitos sob hipóxia e/ou infectados por *S. flexneri*, bem como a taxa de morte celular por apoptose, verificando uma possível relação entre esses agentes.

O conhecimento adquirido no estudo da invasão bacteriana das células, do microambiente em que ocorre essa invasão, bem como as mudanças estruturais e funcionais das células nessas condições, pode nos auxiliar a desenvolver novas metodologias para o tratamento de pacientes portadores de processos infecciosos graves, como a disenteria bacilar provocada por *S. flexneri*. A finalidade deste projeto é contribuir para o entendimento da injúria celular e da resposta imunológica induzida por bactérias invasivas como *S. flexneri*.

## 2. OBJETIVOS

1. Avaliar a taxa de invasão de hepatócitos de rato cultivados expostos a *S. flexneri* em condições de normóxia e hipóxia.
2. Avaliar a produção de TNF- $\alpha$  pelos hepatócitos de rato invadidos por *S. flexneri* em condições de normóxia e hipóxia.
3. Dimensionar a produção e liberação de DHL por hepatócitos de rato após a invasão por *S. flexneri* em condições de normóxia e hipóxia.
4. Quantificar a taxa de morte celular por apoptose em hepatócitos de rato invadidos por *S. flexneri* em condições de normóxia e hipóxia.
5. Avaliar a expressão de HIF-1 $\alpha$  em hepatócitos de rato infectados por *S. flexneri* em condições de normóxia e hipóxia.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Cultura primária de hepatócitos de rato

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas recém-nascidas de até uma semana, em número de 15 animais por experimento, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da FMUSP.

Os animais foram anestesiados em câmara de CO<sub>2</sub> e operados com técnica asséptica em cabine de segurança. Os fígados foram retirados e transferidos para um recipiente estéril contendo 10 mL de solução salina tamponada (PBS - Sigma). O material foi cortado com tesoura fina até a redução dos fígados a pequenos pedaços e o conjunto transferido para tubocone de plástico do tipo Falcon (TPP). A seguir, foi efetuada centrifugação em baixa rotação (700 rpm) durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada à 10 °C (Eppendorf). Após desprezar o sobrenadante, o material foi incubado com a enzima colagenase a 0.2% (Sigma) por 10 minutos em estufa a 37 °C. Após esta etapa, as células foram lavadas três vezes com solução de PBS + Soro Fetal Bovino (SFB – Cultilab) a 20%. O material foi ressuspendido em meio de cultura Williams' E (Sigma) enriquecido com os seguintes suplementos: insulina 10<sup>-8</sup> M (Novo Nordisk), glucagon 10<sup>-9</sup> M (Sigma), hormônio de crescimento humano (GH) 10 µU/mL (Sigma), fator de crescimento epidermal (EGF) 10 ng/mL (Sigma), ampicilina sódica 100 µg/mL (Sigma), estreptomicina 100 µg/mL (Sigma), anfotericina B 5 µg/mL

(Sigma) e 5% de soro fetal bovino. O conjunto foi transferido para placas de cultura de 24 wells (TPP) previamente recobertas em sua base com matriz de laminina (Sigma) na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . Estabelecemos o número de  $1.25 \times 10^5$  células por well como ideal para os experimentos.

As placas foram incubadas em normóxia a 37 °C em estufa de cultura umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar. O meio de cultura foi trocado de dois em dois dias, por um período máximo de oito dias. Foram usadas células com sete ou oito dias de cultura em todos os experimentos.

Denominamos “normóxia” aos grupos de hepatócitos que foram cultivados por sete a oito dias em estufa com 5%  $\text{CO}_2$  e 95% de ar (contendo 21%  $\text{O}_2$ ).

Cada grupo de 15 ratos originou no máximo seis placas de 24 wells, sendo que em todos os experimentos foi feita a triagem das culturas em relação aos aspectos morfológicos das células e presença de organismos contaminantes. Foram retiradas dos experimentos placas com ausência de formação da monocamada de células, excesso de fragmentos celulares ou contaminadas.

A confirmação do cultivo da célula hepática foi realizada através de testes imunohistoquímicos, enzimáticos, e pela comprovação da secreção de albumina “in vitro” conforme descrito por Santos et al. (2005).



### 3.2. Obtenção da hipóxia nas culturas de hepatócitos

O meio de cultura Williams' E foi colocado em garrafas de vidro (50 mL por garrafa) que foram tampadas com rolha vedante. Duas agulhas estéreis foram inseridas na rolha, uma permitindo a entrada de gás nitrogênio ( $N_2$ ) e a outra a saída da atmosfera das garrafas de cultura. A uma rolha foi acoplada uma mangueira conectada a um medidor de fluxo de gás ( $O_2$  Analyzer YSI/53, Yellow Springs Instruments Inc., USA) que por sua vez foi acoplado a um cilindro de nitrogênio molecular ( $N_2$  - White Martins). O nitrogênio foi borbulhado no meio de cultura na vazão de 10 L/min durante 1 hora, com agitação das garrafas de 5 em 5 minutos.

Após a retirada parcial do oxigênio, o meio de cultura Williams' E foi adicionado às placas contendo as culturas de hepatócitos, que rapidamente foram incubadas em câmara hipóxica (Billups-Rotenberg, USA). A câmara foi lavada com nitrogênio molecular ( $N_2$ ) por 30 minutos e então fechada hermeticamente, sendo transferida para estufa a 37 °C.

Em todos os experimentos sob hipóxia as culturas permaneceram por 24 horas na câmara incubadora. Após esse período foram realizadas medições para determinar a porcentagem de oxigênio presente no meio de cultura isolado, e nas culturas de hepatócitos. As medições foram realizadas sem a abertura da câmara hipóxica, através da aspiração do sobrenadante das culturas com seringa com sistema de vedação (Radiometer, Copenhagen), para posterior leitura da pressão parcial de oxigênio (em

mmHg) em aparelho especializado (Radiometer ABL800 Flex, Denmark), cedido gentilmente pelo Laboratório de Pneumologia do HCFMUSP (LIM-09).

Denominamos condição de “hipóxia” aos grupos experimentais de hepatócitos que foram cultivados por sete a oito dias, e então incubados em câmara hipóxica por 24 horas.

### **3.3. Infecção de hepatócitos de rato por *S. flexneri* e taxa de invasão**

Previamente à infecção dos hepatócitos, a bactéria *S. flexneri* foi cultivada em meio BHI por 15 horas. Após esse período, a cultura bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos, e ressuspendida em 1 mL de tampão PBS, sendo adicionada nas culturas celulares nas concentrações desejadas. As culturas de hepatócitos com as bactérias foram então centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm, em centrífuga com rotor especial para placas (Eppendorf), a fim de aumentar o contato da bactéria com as células. Em todos os experimentos de infecção utilizamos a multiplicidade de infecção (MOI) = 5, 50 e 500, e o tempo de infecção de 1 hora.

As culturas foram então lavadas com PBS, sendo a seguir adicionada gentamicina 50 µg/mL diluída em PBS, durante 1 hora. Este procedimento foi realizado para a inibição do crescimento de bactérias que não foram internalizadas pelos hepatócitos. As células foram retiradas da placa com o

uso de 50  $\mu$ L de tripsina (Cultilab) por 1 minuto, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos, e então lisadas com 100  $\mu$ L de Triton a 10% (Sigma) diluído em PBS por mais 5 minutos. O número de bactérias intracelulares viáveis foi determinado pela semeadura de diluição seriada em placas de ágar-sangue.

Para os experimentos de “hipóxia + infecção”, as células foram cultivadas durante sete a oito dias, colocadas em ambiente hipóxico por 24 horas (ver subitem 3.2.) e então infectadas por 1 hora com *S. flexneri* nas respectivas MOIs, com prévia centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos, em centrífuga com rotor especial para placas (Eppendorf). Nos experimentos de “normóxia + infecção” as células no 7<sup>o</sup> ou 8<sup>o</sup> dia de cultura em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar (contendo 21% O<sub>2</sub>) foram infectadas com a bactéria.

Os experimentos foram realizados sempre em octuplicatas por no mínimo 5 vezes, sendo descartadas as placas com crescimento de colônias contaminantes. Os resultados foram expressos em número de bactérias recuperadas por cm<sup>2</sup> de células confluentes, cultivadas em placas de 24 wells.

#### **3.4. Viabilidade celular e análise da morfologia em microscópio óptico**

Foi determinada a viabilidade dos hepatócitos nos quatro grupos experimentais (normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção) através do uso do corante vital Trypan Blue (Sigma).

As células foram retiradas das placas com o uso de Tripsina (ver item 3.3.) e centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Alíquotas de 50 µL da suspensão celular foram diluídas em 50 µL de Trypan Blue, e visualizadas em câmara de Neubauer (Hausser Scientific Horsham, PA, USA) ao microscópio óptico, para determinação da porcentagem de células viáveis (não-coradas) e inviáveis (coradas). Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de viabilidade celular, calculados pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Número de células viáveis (não coradas)}}{\text{Número de células viáveis + células não viáveis (coradas)}}$$

Nesta etapa de padronização dos grupos normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção foram feitas colorações das culturas de hepatócitos, para a visualização da morfologia celular. Lamínulas redondas de 13 mm (Glasscyto) foram esterilizadas no fogo e colocadas em placas de 24 wells. Procedeu-se a cultura de hepatócitos sobre as lamínulas como descrito no item 3.1. Foram realizadas colorações com os corantes hematoxilina (Sigma) e eosina (Sigma), seguindo o seguinte protocolo:

- Lavagem das lamínulas com PBS;
- Fixação em metanol (Merck) por 2 minutos;
- Hidratação partindo de álcool 70% até água destilada, 5 minutos cada etapa;
- Incubação com hematoxilina por 20 minutos;
- Lavagem em água destilada;

- Incubação com eosina por 20 minutos;
- Lavagem em água destilada;
- Desidratação partindo do álcool 50% até o álcool 100%, 5 minutos cada etapa;
- Fixação em xilol por 1 minuto.

Após o processo de coloração, as lamínulas foram aderidas em lâminas para microscopia com o uso do Bálsamo do Canadá, e secadas em temperatura ambiente por 72 horas. A visualização das células coradas foi feita em microscópio óptico com sistema de captura digital de imagens, cedido gentilmente pelo Laboratório Micologia Médica do HCFMUSP (LIM-53).

### **3.5. Detecção de TNF- $\alpha$ liberado pelo método ELISA**

Avaliamos a liberação do TNF- $\alpha$  através do método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) direto, baseado na detecção da citocina através de ligação com anticorpo e reação do substrato com cromógeno, utilizando kit específico (Biotrak ELISA, Amersham).

Nesse método foram aplicados 50  $\mu$ L de tampão pré-tratamento em cada poço de placa de 96 wells, previamente sensibilizada com o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . Em seguida foram aplicados 50  $\mu$ L dos controles (meio de

cultura) e das amostras em duplicata. A placa foi incubada à temperatura ambiente (25 °C) por 1 hora e, após esse período, lavada três vezes com solução tampão. A seguir foram adicionados 50 µL de anticorpo biotilado em cada poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora, e após esse período foi novamente lavada por três vezes com solução tampão. Foram aplicados 100 µL de estreptoavidina HRP (“horseradish peroxidase”) em cada poço e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir foi efetuada nova lavagem da placa por três vezes com solução tampão. Foram adicionados 100 µL de substrato TMB (tetrametilbenzidina) em cada poço, com posterior incubação ao abrigo de luz e bloqueio da reação após 10 minutos, utilizando 100 µl da solução “stop” fornecida pelo kit.

A absorbância foi medida em aparelho leitor de ELISA, nos comprimentos de onda de 450 nm e 550 nm. Utilizamos software específico (Soft Max Pro) para realizar a subtração dos resultados da leitura nas absorbâncias mencionadas, com respectivo resultado transformado em pg/ml, de acordo com os resultados da curva padrão realizada no ensaio. O leitor de ELISA e software específico foram cedidos gentilmente pelo Laboratório de Imunologia do HCFMUSP (LIM-48). Os experimentos foram realizados sempre em triplicatas.

### 3.6. Detecção da produção e liberação de DHL

Foi realizada a análise da produção e liberação de DHL utilizando-se kit colorimétrico específico (Sigma). Os experimentos foram realizados em duas etapas: 1) sem lise celular, para dimensionar apenas a quantidade de DHL liberado e 2) com lise celular, para dimensionar a quantidade de DHL total (intracelular + liberado).

As etapas foram realizadas na seguinte sequência:

- Etapa 1: as culturas de hepatócitos em placas de 24 wells foram centrifugadas a 1100 rpm por 4 minutos e então uma alíquota de 50 µl foi transferida de cada well para uma placa de 96 wells.
- Etapa 2: em cada well da placa de 24 wells foi adicionado 1/10 de tampão de lise fornecido pelo kit seguido de incubação à 37 °C por 45 minutos. Após esse período a placa foi centrifugada à 1100 rpm por 4 minutos e então uma alíquota de 50 µl foi transferida de cada well para uma placa de 96 wells.

Em seguida foi realizado o procedimento enzimático comum aos dois tipos de amostras (DHL liberado e DHL total), no qual foi adicionado a cada well 100 µl de solução contendo volumes iguais de substrato, cofator e corante. A placa foi então incubada por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz.

A reação foi bloqueada com a adição de 15 µl de HCl 1M em cada well, sendo realizada em seguida a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 490 nm e 690 nm. Os resultados derivaram da

subtração do resultado do comprimento de onda de 490 nm menos o comprimento de onda de 690 nm realizado em software específico (Soft Max Pro).

A análise dos dados foi realizada através do cálculo da porcentagem de citotoxicidade, de acordo com a fórmula:

$$\% \textit{Citotoxicidade} = 100 \times \frac{\textit{DHL liberado}}{\textit{DHL total}}$$

Onde:

DHL liberado: resultado de absorbância de hepatócitos não-lisados.

DHL total: resultado de absorbância de hepatócitos lisados.

### **3.7. Quantificação da taxa de morte celular por apoptose**

A taxa de morte celular por apoptose foi quantificada através de identificação visual pelo método TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) - Mediated dUTP Nick-End Labeling) que consiste na ligação de TdT à grupos 3'-OH livres de fragmentos de DNA, o que evidencia a perda de integridade genômica.



Os grupos experimentais de hepatócitos foram cultivados em lamínulas de vidro (13 mm) em placas de 24 wells e fixados com paraformaldeído 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram reidratadas com TBS (Tris Buffered Saline – Sigma) por 15 minutos em temperatura ambiente e permeabilizadas com proteinase K diluída 1:100 por 5 minutos, seguido de duas lavagens com TBS.

As células então foram incubadas com tampão de equilíbrio fornecido pelo kit por 15 minutos, seguido de incubação com mix de reação e enzima para marcação das células apoptóticas, por 1 hora a 37 °C.

Após esse período as células foram lavadas com TBS por duas vezes e as lamínulas foram montadas em lâmina de vidro utilizando meio de montagem específico fornecido pelo kit, contendo DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole) para visualização dos núcleos.

Os resultados basearam-se na observação das lâminas ao microscópio de fluorescência e contagem das células apoptóticas (coradas com fluoresceína) no total de dez campos por lamínula, sendo expressos pela porcentagem de células apoptóticas de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ células apoptóticas} = 100 \times \frac{\text{número de células apoptóticas}}{\text{número de células totais}}$$

Os experimentos foram realizados sempre em octuplicatas. Todos os reagentes da técnica de TUNEL foram provenientes de kit específico

FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Fluorescent – TdT Enzyme (Calbiochem, USA).

### **3.8. Detecção da expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$**

O fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  foi detectado pelo emprego da técnica de imunofluorescência. Os grupos experimentais de células cultivadas em lamínulas redondas de vidro (13 mm) foram lavados com PBS uma vez, fixados em paraformaldeído 4% por 10 minutos e lavados novamente por três vezes com PBS. As células foram permeabilizadas com Triton X-100 (Sigma) diluído a 1% em PBS por 10 minutos, e então lavadas com PBS.

A fim de evitar a ligação do anticorpo primário em sítios inespecíficos foi realizado um bloqueio com BSA (Inlab) diluído a 3% em PBS, acrescido de 0.1% de Triton X-100 por 30 minutos. Os hepatócitos foram então incubados com o anticorpo primário anti-HIF-1 $\alpha$  produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), na concentração de 1:100 diluído em PBS/BSA 1% e incubado à 4 °C por 18 horas.

Após esse período as células foram lavadas por quatro vezes, 5 minutos em cada vez, com PBS acrescido de 0.1% de Triton X-100, e então incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com FITC, na concentração de 1:80 diluído em PBS/BSA 1% ao abrigo de luz.

As células foram lavadas por quatro períodos de 5 minutos com PBS acrescido de 0.1% de Triton X-100 e as lamínulas montadas em lâminas de vidro utilizando-se o meio DTG (Dabco, Tris, Glicerol – Sigma) acrescido de DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole – Sigma) na concentração de 1:250. As lâminas foram observadas em microscópio confocal (Carl Zeiss Laser Scanning Systems – LSM – 510) cedido gentilmente pelo Núcleo de Microscopia Confocal da Rede Multiusuários do complexo HCFMUSP. Os experimentos foram realizados sempre em triplicatas.

### **3.9. Análise Estatística**

Os dados foram comparados inicialmente quanto a normalidade e determinados como não paramétricos por não aderirem a curva Normal pelo teste de distância K-S.

Quando foram comparados três ou mais grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn (viabilidade celular, liberação de TNF- $\alpha$ , produção e liberação de DHL) e Student-Newman Keuls (recuperação de bactérias intracelulares e apoptose). Quando houve somente dois grupos de comparação foi utilizado o teste de Mann-Whitney (meio Williams' E em normóxia e hipóxia e meio Williams' E nas culturas de hepatócitos em normóxia e hipóxia). Foi considerado risco alfa menor ou igual a 0.05 para todos os dados do estudo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Padronização do microambiente hipóxico

#### 4.1.1. Retirada parcial de oxigênio do meio de cultura

A retirada parcial de oxigênio do meio de cultura Williams' E resultou em redução da  $pO_2$  em aproximadamente 75%, quando comparado com o meio controle, em normóxia (Tabela 1).

Tabela 1. Pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ) no meio de cultura de hepatócitos Williams' E nas condições de normóxia e hipóxia (após borbulhamento de  $N_2$  por 1 hora com agitação a cada 5 minutos).

Meio Williams' E	Grupo	25 %	Mediana	75 %	<i>P</i>
<b><math>Po_2</math> (mmHg)</b>	Normóxia	188	189	190	0.03
	Hipóxia	44.95	47.30	49.45	

Nota: Aplicado teste de Mann-Whitney

#### 4.1.2. Obtenção de microambiente hipóxico nas culturas de hepatócitos

Quando realizamos a medida de oxigênio basal do meio Williams' E nas culturas de hepatócitos, observamos que nosso sistema de retirada parcial de oxigênio do meio de cultura, e posterior incubação em câmara hipóxica por 24 horas (com lavagem da câmara hipóxica por 30 minutos com N<sub>2</sub>) reduziu em 70% a concentração de oxigênio (Tabela 2). Esta redução correspondeu a pO<sub>2</sub> final de 43.2 mmHg (equivalente à 6.5% O<sub>2</sub>).

Tabela 2. Pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub>) no meio de cultura de hepatócitos Williams' E nas condições de normóxia em contato com os hepatócitos por 24 horas e hipóxia (após borbulhamento de N<sub>2</sub> por 1 hora com agitação a cada 5 minutos), com posterior incubação em câmara hipóxica por 24 horas.

Williams' E + Hepatócitos	Grupo	25%	Mediana	75%	<i>P</i>
pO <sub>2</sub> (mmHg)	Normóxia	140	140.50	141	0.02
	Hipóxia	41.70	43.20	43.65	

Nota: Aplicado teste de Mann-Whitney

O meio de cultura Williams' E em contato com os hepatócitos por 24 horas, apresentou redução de aproximadamente 25% do oxigênio quando comparado ao meio controle sem contato com os hepatócitos (comparação da  $pO_2$  em normóxia entre as tabelas 1 e 2). Podemos notar também, que em microambiente hipóxico por 24 horas, os hepatócitos consumiram 8.6% do oxigênio presente quando comparado à concentração de oxigênio no meio controle em hipóxia (comparação entre tabelas 1 e 2).

#### **4.2. Invasão de hepatócitos de rato por *S. flexneri* nas condições de normóxia e hipóxia**

A recuperação de bactérias intracelulares em hepatócitos de rato evidenciou diminuição da entrada das bactérias nos hepatócitos submetidos à hipóxia (Fig. 1). Comparando a entrada das bactérias nos hepatócitos em normóxia e hipoxia, nas diferentes MOIs, observamos que houve diferença significativa entre os grupos na MOI 500, não sendo observada diferença significativa nas outras MOIs. Além disso, a entrada das bactérias nos hepatócitos foi MOI-dependente, ou seja, quanto maior o número de bactérias em contato com as células, maior foi o número de bactérias intracelulares recuperadas, com diferença significativa entre as MOIs (Apêndice 2 – tabela estatística).

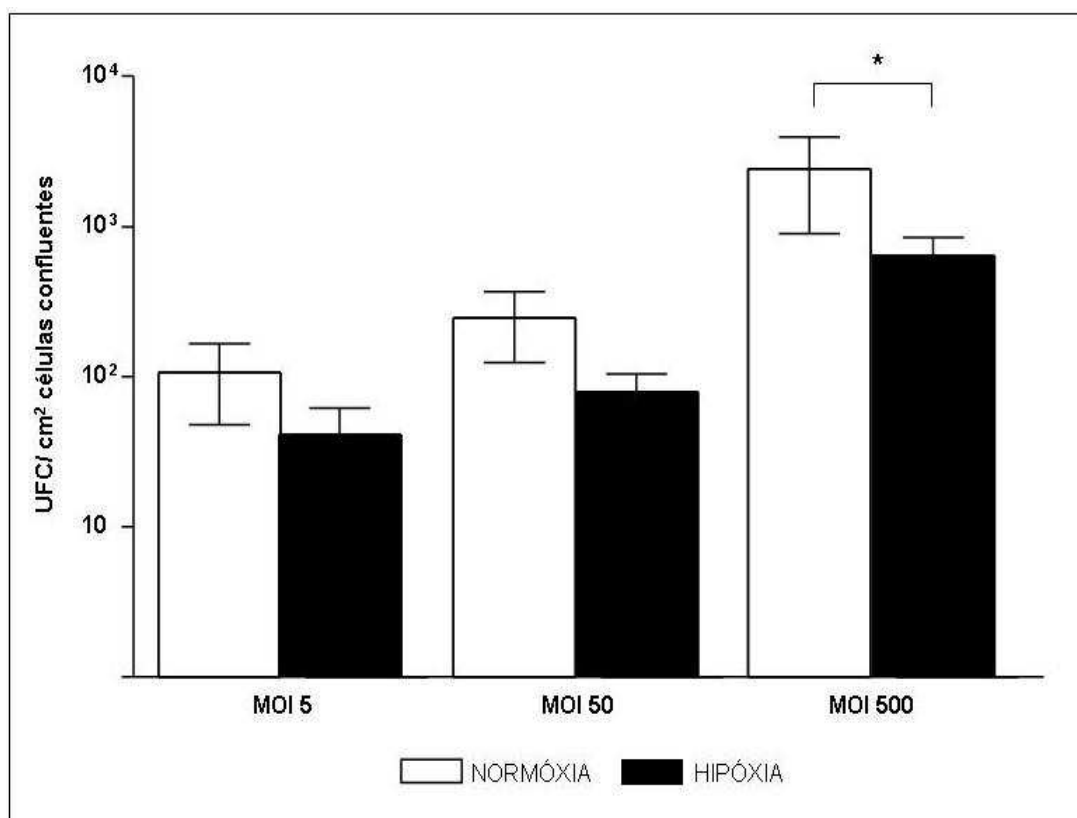


Fig. 1. Recuperação intracelular de *S. flexneri* em hepatócitos de rato nas condições de normóxia e hipóxia por 24 horas (6.5% O<sub>2</sub>) nas MOIs 5, 50 e 500. Nota: \* =  $P \leq 0.05$

Tabela 3. Recuperação intracelular de *S. flexneri* em hepatócitos de rato nas condições de normóxia e hipóxia por 24 horas (6.5% O<sub>2</sub>) nas MOIs 5, 50 e 500.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>N (MOI 5)</b>	24	106.50	58.79
<b>N (MOI 50)</b>	24	246	121.40
<b>N (MOI 500)</b>	19	2.42	1.52
<b>H (MOI 5)</b>	15	40.91	20.95
<b>H (MOI 50)</b>	28	79.14	24.84
<b>H (MOI 500)</b>	33	638.80	204.10

Nota: Aplicado teste de Student Newman-Keuls

#### **4.3. Viabilidade dos hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção**

A viabilidade dos hepatócitos de rato em todas as situações experimentais variou entre 74 e 86%, não apresentando diferença significativa entre os grupos (Fig. 2).



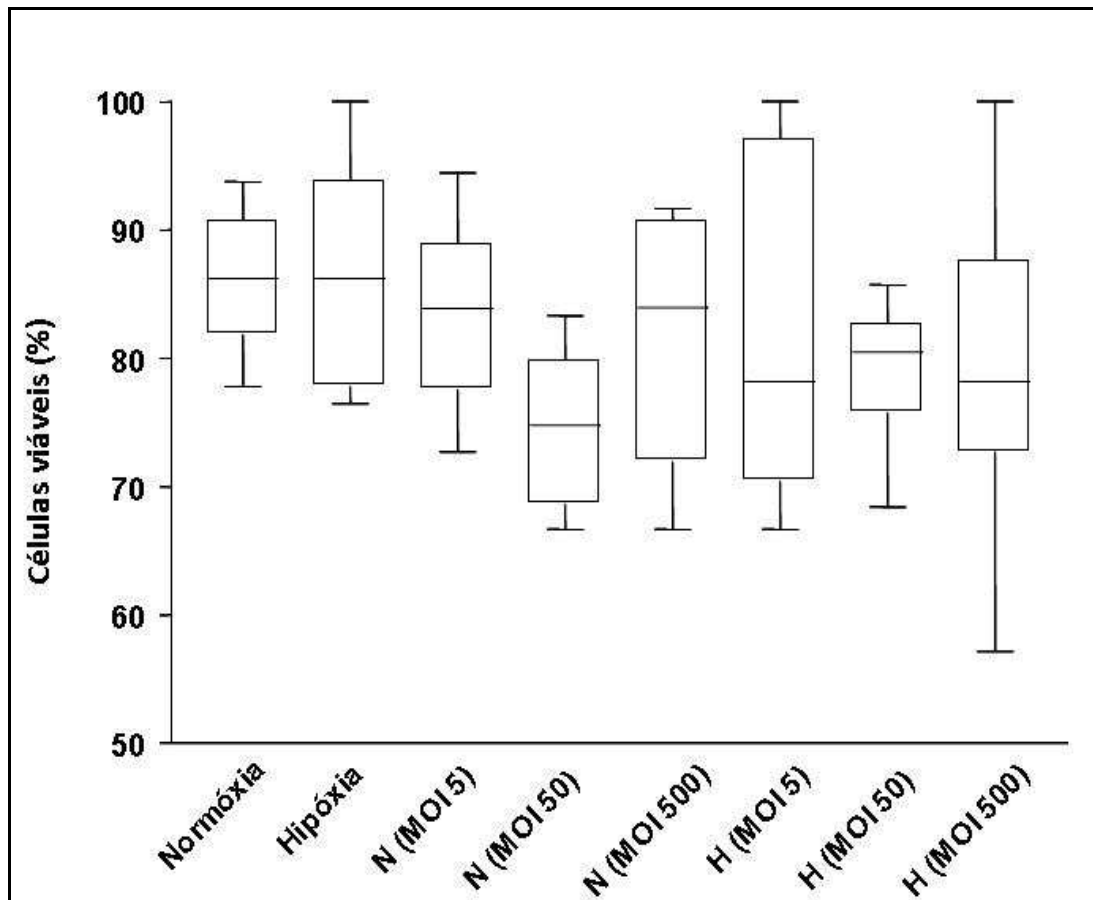


Fig. 2. Viabilidade de hepatócitos de rato dimensionada pela coloração por Trypan Blue nas situações de normóxia, hipóxia por 24 horas, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* em diferentes MOIs (5, 50 e 500). Os grupos N (MOI5), N (MOI50) e N (MOI500) representam os grupos de hepatócitos em normóxia e infectados com *S. flexneri*; os grupos H (MOI5), H (MOI50) e H (MOI500) representam os grupos de hepatócitos em hipóxia por 24 horas, posteriormente infectados com *S. flexneri*.

Nota:  $P = 0.21$

Tabela 4. Viabilidade de hepatócitos de rato dimensionada pela coloração por Trypan Blue nas situações de normóxia, hipóxia por 24 horas, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* em diferentes MOIs (5, 50 e 500).

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Normóxia</b>	8	86.21	81.81	90.71
<b>Hipóxia</b>	8	86.21	77.76	93.88
<b>N (MOI 5)</b>	8	83.88	77.50	88.25
<b>N (MOI 50)</b>	6	74.77	70.58	76.47
<b>N (MOI 500)</b>	8	83.95	71.87	90.76
<b>H (MOI 5)</b>	6	78.17	74.07	94.11
<b>H (MOI 50)</b>	8	80.47	75.71	82.69
<b>H (MOI 500)</b>	8	78.17	72.67	87.59

Nota: aplicado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn

#### **4.4. Morfologia de hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção**

A visualização dos hepatócitos em normóxia por microscopia óptica evidenciou células distribuídas em monocamadas, com amplo contato entre elas, núcleos bem definidos com nucléolos evidentes, citoplasma volumoso e sinais de proliferação celular com figuras de mitose (Fig. 3A).

Em hipóxia pudemos observar que os hepatócitos estavam distribuídos com maior espaçamento entre si, com ruptura da monocamada, presença de núcleos picnóticos e vacúolos intracelulares (Fig. 3B).

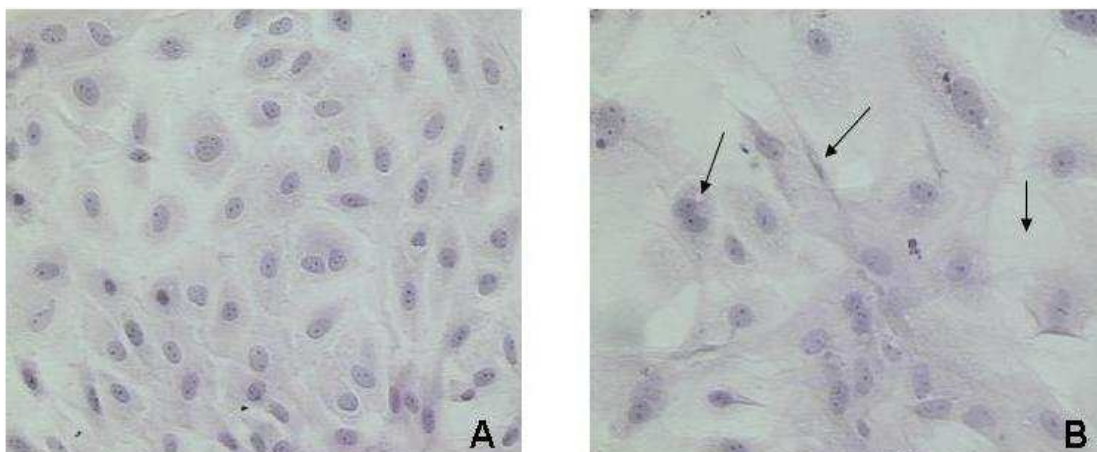


Fig. 3. Hepatócitos de rato corados com hematoxilina e eosina. A: condição de normóxia, hepatócitos com 7 dias de cultivo em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar (contendo 21% de O<sub>2</sub>) à 37 °C; B: condição de hipóxia, hepatócitos em câmara incubadora preenchida com N<sub>2</sub> por 24 horas à 37 °C. As setas indicam vacúolo, núcleo picnótico e perda da junção celular. (400x)

Hepatócitos cultivados em normóxia e infectados por *S. flexneri* apresentaram alterações morfológicas semelhantes aos hepatócitos submetidos à hipóxia, a saber: ruptura da monocamada, presença de vacúolos intracelulares e núcleos picnóticos (Fig. 4A, 4B e 4C). Além disso, em muitas células foi evidente a presença de bactérias no citoplasma, em todas as MOIs testadas (5:1, 50:1 e 500:1) (Fig. 6A, 6B e 6C). O mesmo fenômeno ocorreu com hepatócitos submetidos à hipóxia e infectados com a bactéria, porém em grau mais intenso, com ruptura ainda maior da monocamada celular, e presença de células muito vacuolizadas (Fig. 5A, 5B e 5C). Também foi possível a observação de bactérias no citoplasma de

hepatócitos em hipóxia e infectados, em todas as MOIs utilizadas (Fig. 6D, 6E e 6F).

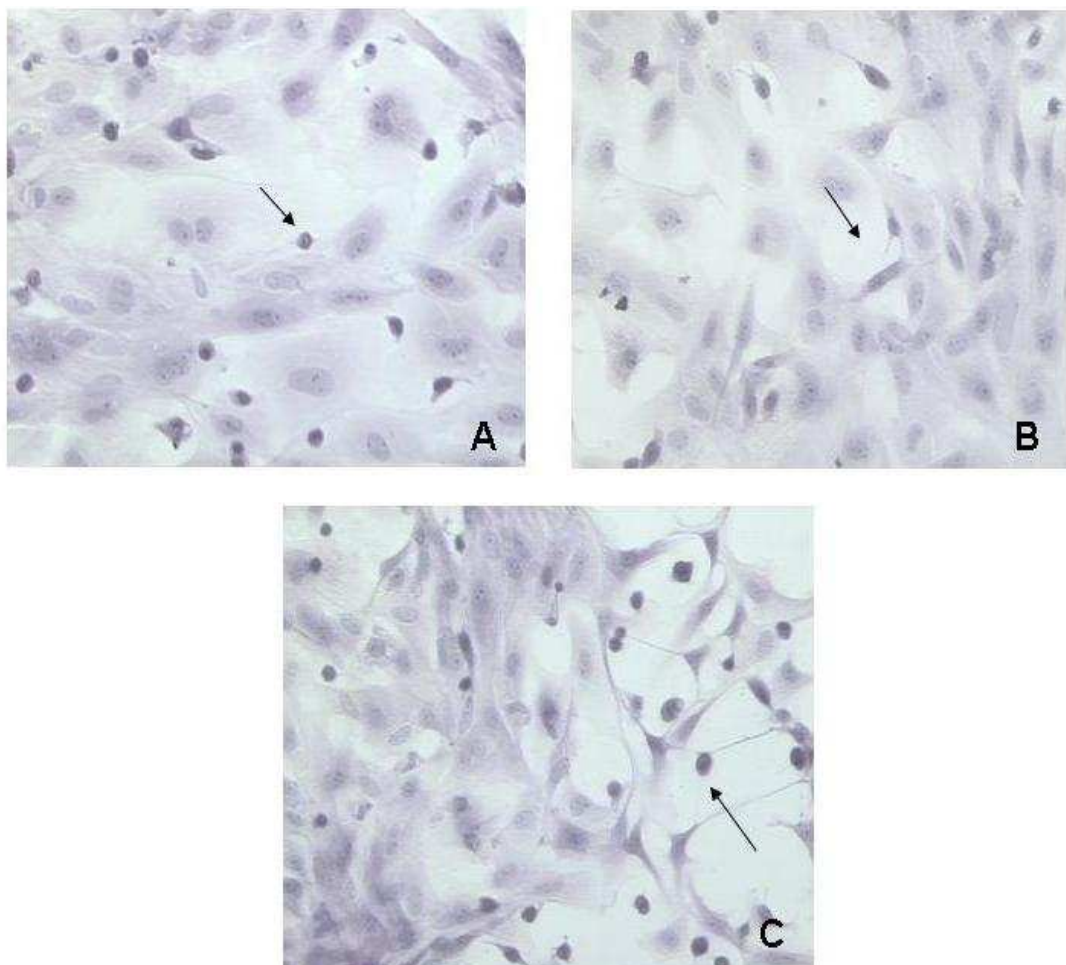


Fig. 4. Hepatócitos de rato em condição normóxica infectados por *S. flexneri* e corados com hematoxilina e eosina. MOI 5 (A), MOI 50 (B) e MOI 500 (C). As setas indicam núcleos picnóticos e ruptura da monocamada celular. (400x)

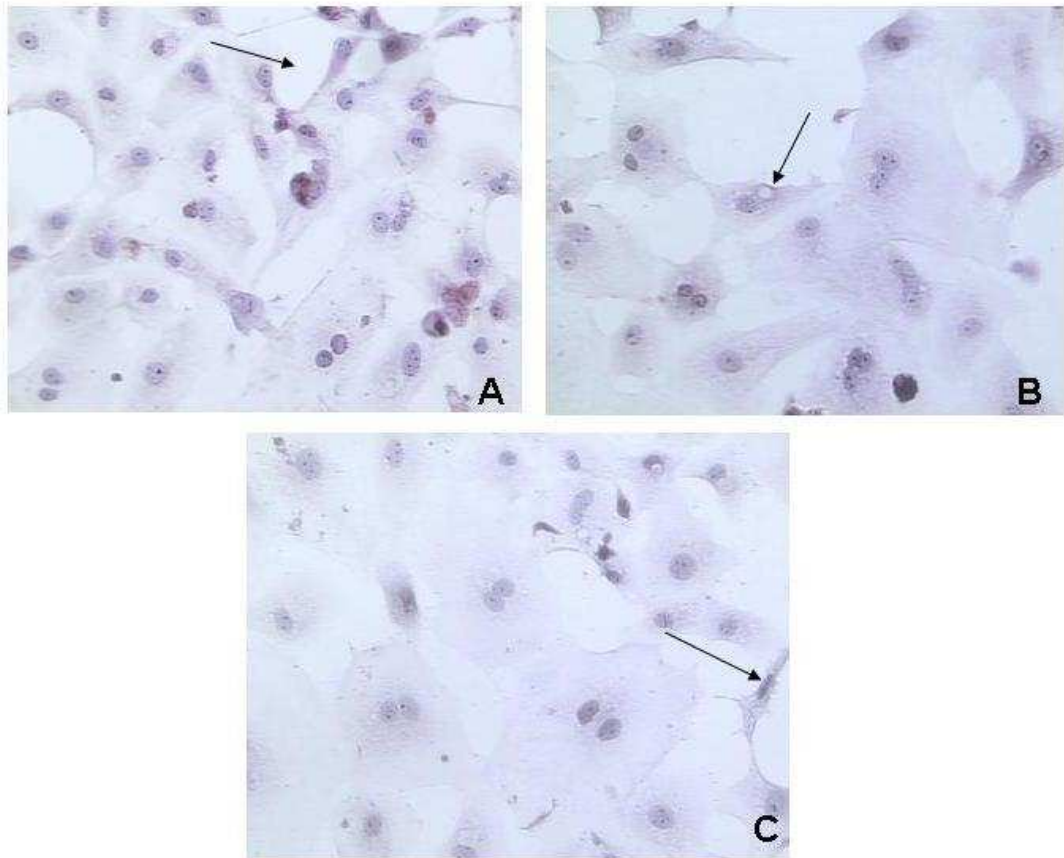


Fig. 5. Hepatócitos de rato submetidos à hipóxia e infectados com *S. flexneri*. MOI 5 (A), MOI 50 (B) e MOI 500 (C). As setas indicam presença de núcleos picnóticos, vacúolo e perda da junção celular. (400x)

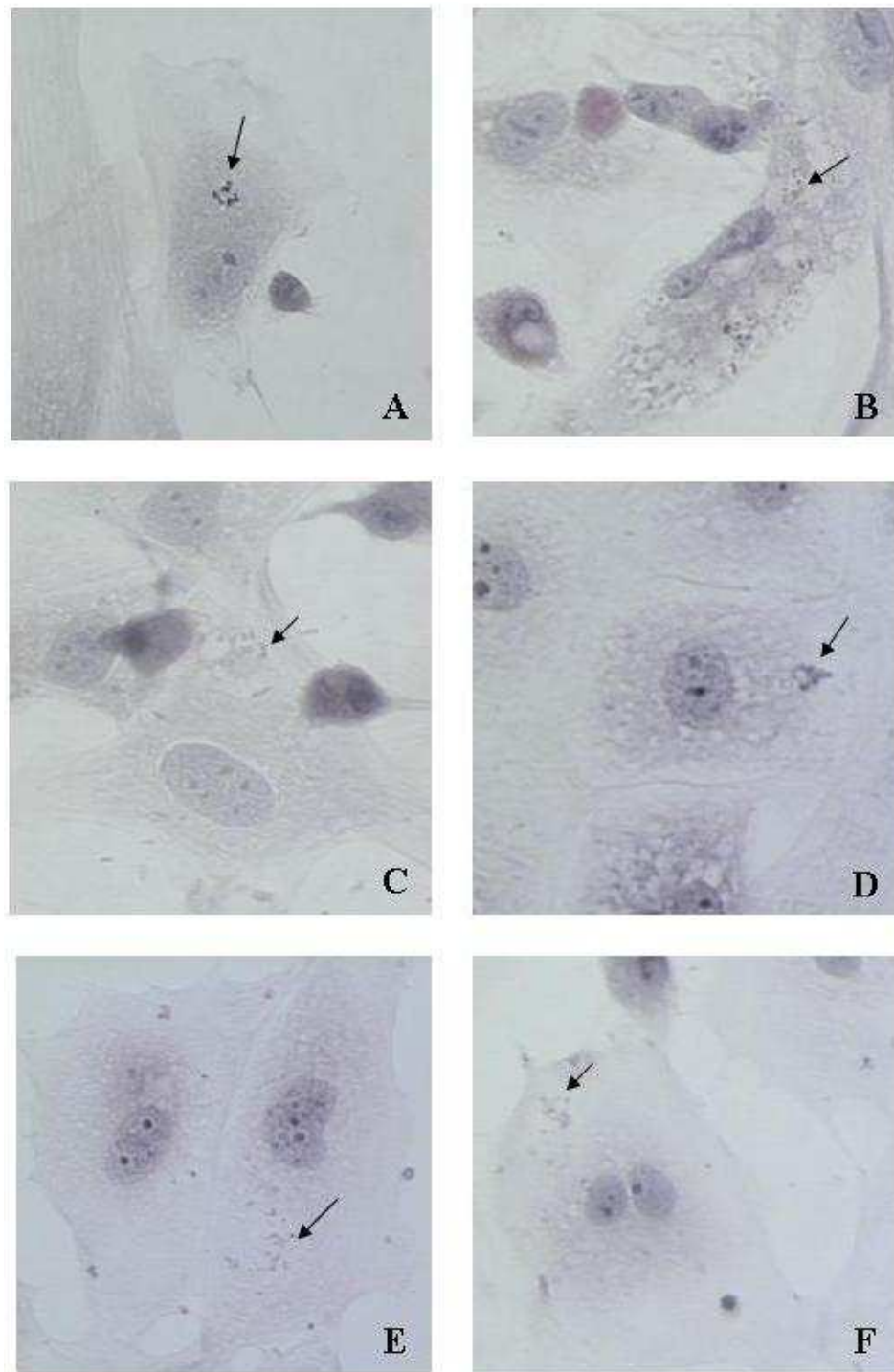


Fig. 6. Hepatócitos de rato infectados por *S. flexneri* e corados com hematoxilina e eosina nas situações de normóxia: MOI 5 (A), MOI 50 (B), MOI 500 (C); e hipóxia: MOI 5 (D), MOI 50 (E) e MOI 500 (F). As setas indicam presença da bactéria. (1000x)

#### **4.5. Liberação de TNF- $\alpha$ por hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção**

Verificamos que a infecção dos hepatócitos de rato por *S. flexneri* resultou em aumento da liberação de TNF- $\alpha$  pelas células invadidas, sendo que quanto maior foi a MOI utilizada, maior também foi a tendência de liberação desta citocina pelas células (Fig. 7 e Tabela 5).

Não houve diferença significativa entre a liberação de TNF- $\alpha$  por hepatócitos de rato em normóxia e hipóxia. O grupo hipóxia + infecção liberou maior quantidade de TNF- $\alpha$ , porém sem atingir o patamar de liberação do grupo normóxia + infecção (Fig. 7). Observamos também que em hipóxia, a multiplicidade de infecção não foi um fator relevante na determinação da quantidade de TNF- $\alpha$  liberado pelas células, ou seja, mesmo quando em maior número, a bactéria *S. flexneri* não estimulou as células a liberarem a citocina nos mesmos níveis observados na infecção em normóxia (Fig. 7 e Apêndice 2 – tabela estatística).

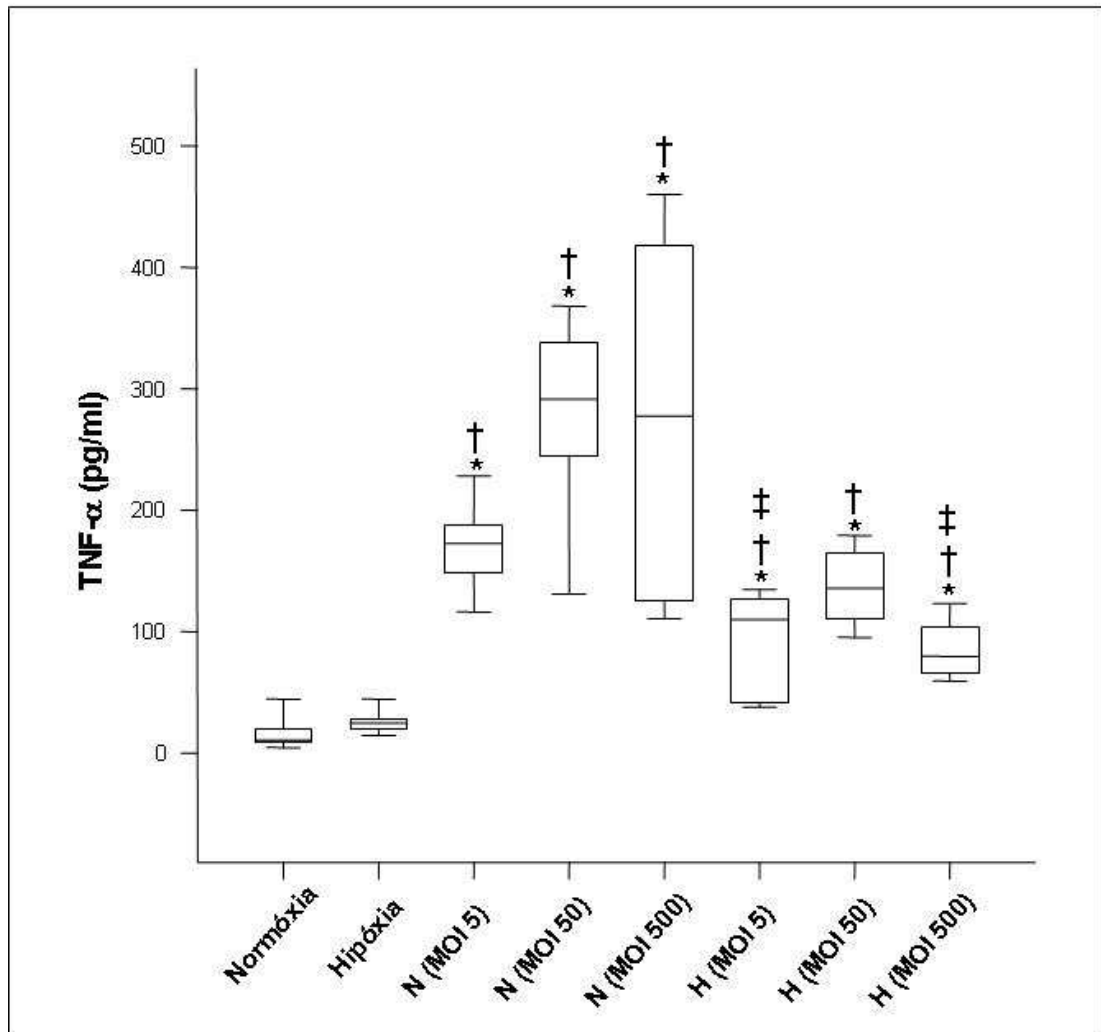


Fig. 7. Liberação de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de culturas de hepatócitos nas situações de normóxia (N), hipóxia (H), normóxia + infecção (N+MOI) e hipóxia + infecção (H+MOI) por *S. flexneri* nas MOIs: 5, 50 e 500.

Nota: \* =  $P \leq 0.05$  vs. Normóxia; † =  $P \leq 0.05$  vs. Hipóxia; ‡ =  $P \leq 0.05$  vs. N (MOI 5), N (MOI 50) e N (MOI 500)



Tabela 5. Liberação de TNF- $\alpha$  por hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia por 24 horas, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* em diferentes MOIs (5, 50 e 500).

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Normóxia</b>	42	10.93	8.70	19.32
<b>Hipóxia</b>	48	24.57	20.16	28.05
<b>N (MOI 5)</b>	26	172.68	150.69	187.15
<b>N (MOI 50)</b>	31	291.32	246.59	335.60
<b>N (MOI 500)</b>	34	277.55	126.79	414.77
<b>H (MOI 5)</b>	36	109.93	41.18	125.88
<b>H (MOI 50)</b>	36	135.72	111.29	164.35
<b>H (MOI 500)</b>	29	79.80	65.85	103.78

Nota: aplicado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn

#### **4.6. Produção e liberação de DHL por hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção**

A citotoxicidade dimensionada pela produção e liberação de DHL foi significativamente maior no grupo de células submetidos à hipóxia em comparação com o grupo normóxico (Fig. 8 e Tabela 6).

Tanto na condição de normóxia + infecção como hipóxia + infecção a concentração bacteriana não foi determinante para o aumento ou diminuição

da produção e liberação de DHL, não havendo diferenças significativas nos resultados entre os grupos de infecção (Fig. 8).

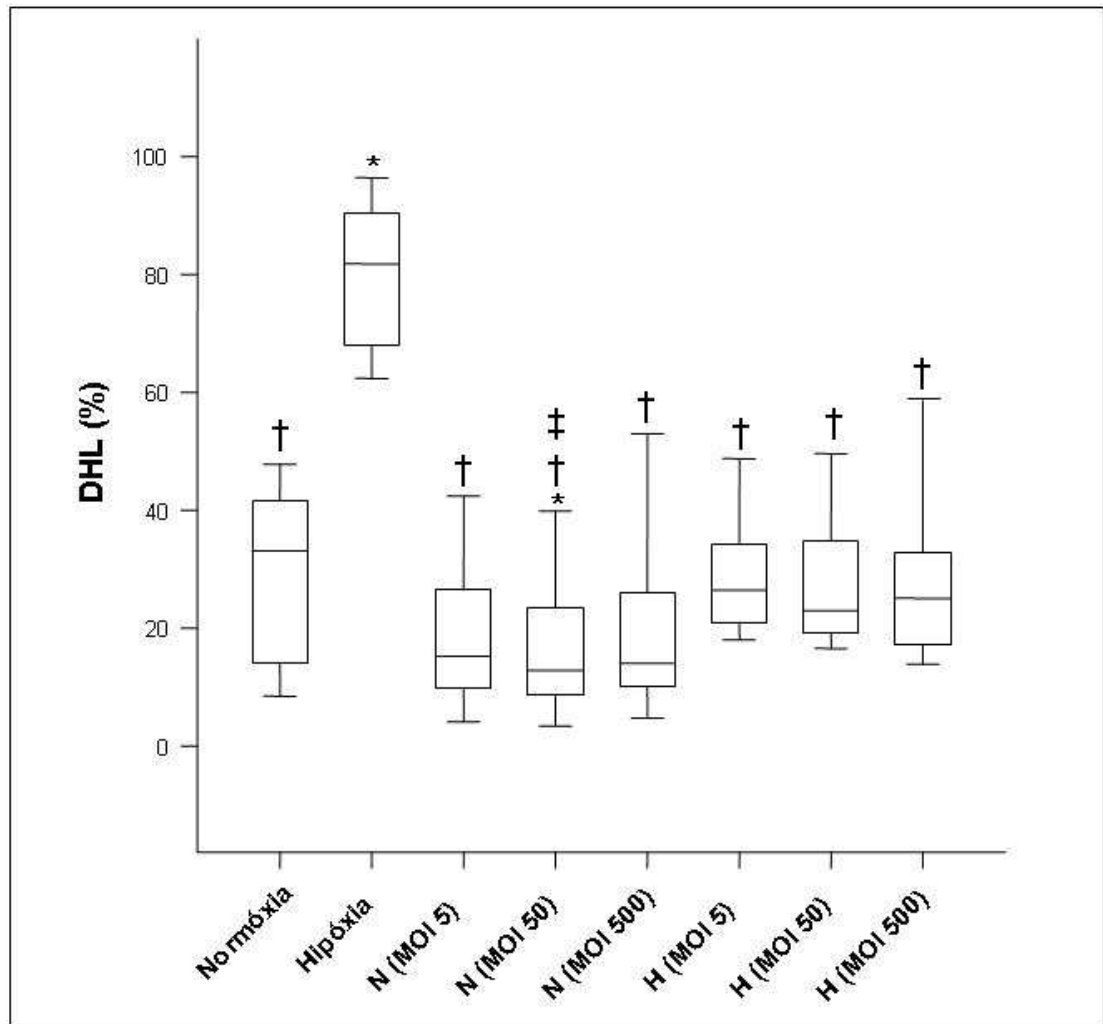


Fig. 8. Porcentagem de citotoxicidade (produção e liberação de DHL) em hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* na multiplicidade de infecção (MOI): 5, 50 e 500.

Nota: \* =  $P \leq 0.05$  vs. Normóxia; † =  $P \leq 0.05$  vs. Hipóxia; ‡ =  $P \leq 0.05$  vs. H (MOI 5) e H (MOI 50)

Tabela 6. Porcentagem de citotoxicidade (produção e liberação de DHL) em hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* na multiplicidade de infecção (MOI): 5, 50 e 500.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Mediana</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>
<b>Normóxia</b>	45	33.09	14.84	41.45
<b>Hipóxia</b>	37	81.82	67.99	90.33
<b>N (MOI 5)</b>	33	15.24	9.85	24.51
<b>N (MOI 50)</b>	33	12.82	8.77	22.68
<b>N (MOI 500)</b>	34	14.06	10.25	25.07
<b>H (MOI 5)</b>	28	26.42	21.27	34.22
<b>H (MOI 50)</b>	28	22.97	19.23	33.75
<b>H (MOI 500)</b>	28	25.05	17.21	31.96

Nota: aplicado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Müller-Dunn

#### **4.7. Quantificação da morte de hepatócitos de rato por apoptose nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção**

Verificamos que a porcentagem de células apoptóticas aumentou significativamente nas condições de hipóxia e/ou infecção (Fig. 9 e Tabela 7). O grupo hipóxia não apresentou diferença significativa em relação aos grupos de infecção. As taxas de apoptose não aumentaram

significativamente entre as MOIs 5, 50 e 500 nos grupos de infecção em normóxia e hipóxia.

O grupo normóxia + infecção (MOI 5, 50 e 500) não apresentou diferença significativa em comparação com o grupo hipóxia + infecção (MOI 5, 50 e 500), com exceção dos grupos de normóxia MOI 5 e normóxia MOI 50, que apresentaram diminuição significativa quando comparados com o grupo hipóxia MOI 500 (Fig. 9 e Apêndice 2 - tabela estatística).

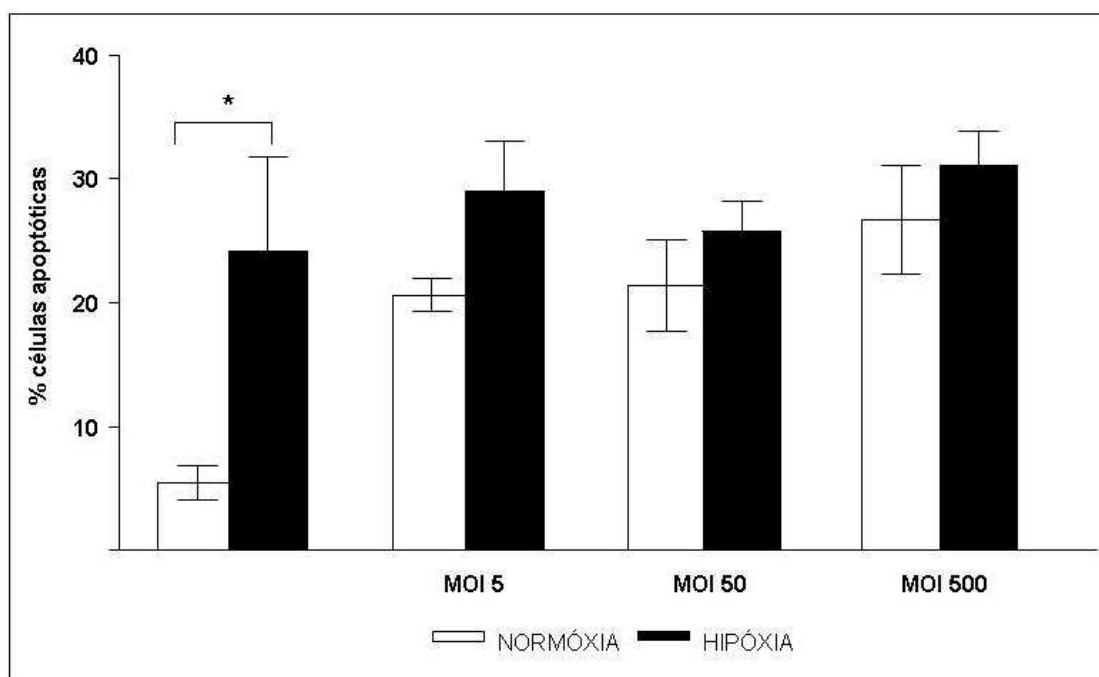


Fig. 9. Porcentagem de apoptose em hepatócitos de rato nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção (MOI 5, 50 e 500).

Nota: \* =  $P \leq 0.05$

Tabela 7. Porcentagem de hepatócitos de rato em apoptose nas situações de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção por *S. flexneri* na multiplicidade de infecção (MOI): 5, 50 e 500.

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Normóxia</b>	8	5.48	1.38
<b>Hipóxia</b>	8	24.11	7.71
<b>N (MOI 5)</b>	4	20.60	1.32
<b>N (MOI 50)</b>	4	21.39	3.66
<b>N (MOI 500)</b>	4	26.69	4.34
<b>H (MOI 5)</b>	5	28.98	4.04
<b>H (MOI 50)</b>	4	25.74	2.51
<b>H (MOI 500)</b>	4	31.09	2.79

Nota: Aplicado teste de Student Newman-Keuls

#### **4.8. Expressão de HIF-1 $\alpha$ por hepatócitos de rato nas situações experimentais de normóxia, hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção**

Verificamos que houve a expressão de HIF-1 $\alpha$  nos hepatócitos submetidos à hipóxia (Fig. 11A), e infectados com *S. flexneri* nas condições de normóxia e hipóxia, nas MOIs 50 e 500 (Fig. 10C, 10D e 11C, 11D). Hepatócitos em normóxia (Fig. 10A) e infectados com *S. flexneri* na MOI 5 (Fig. 10C e 11C) não expressaram HIF-1 $\alpha$ .

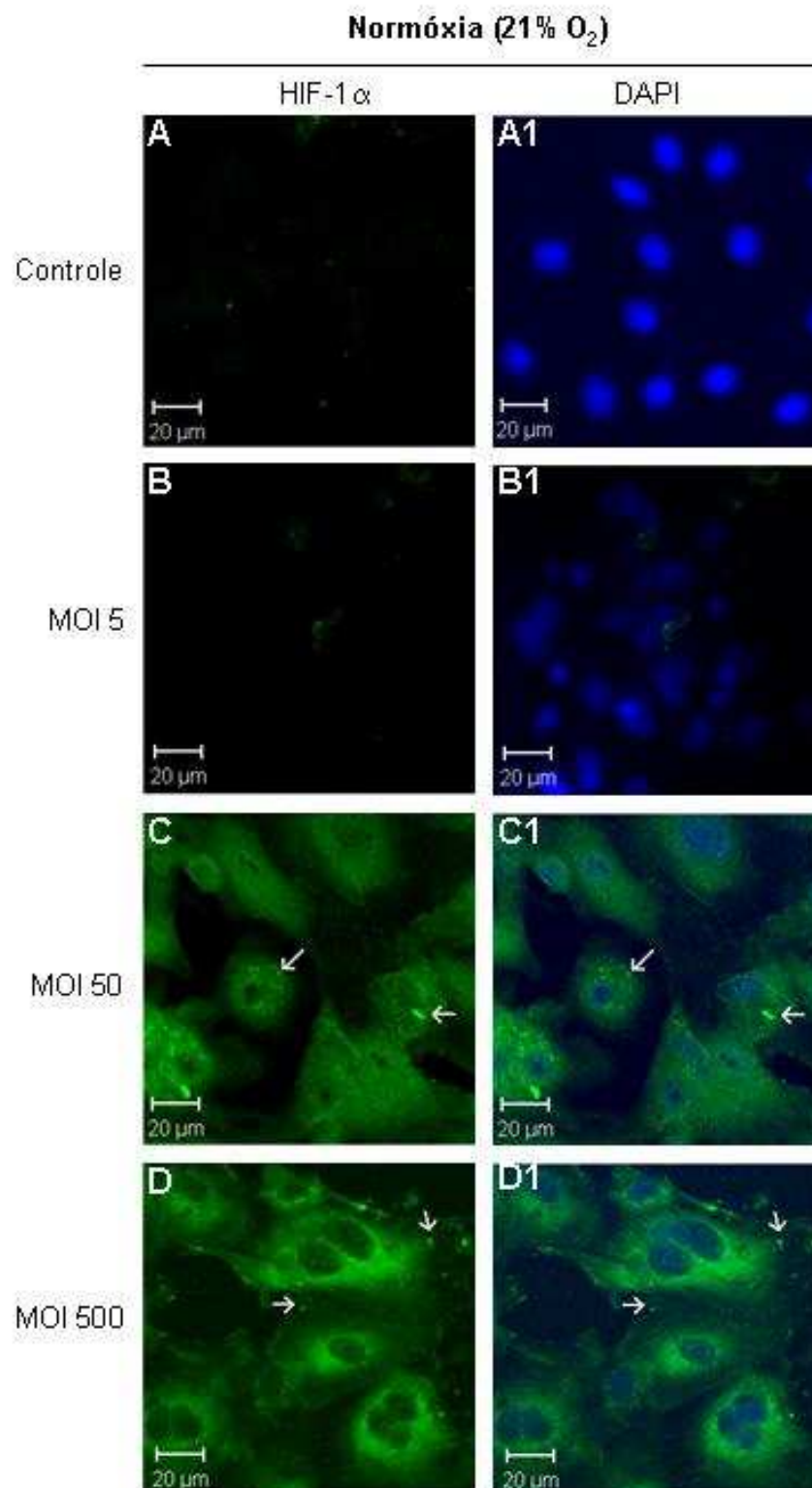


Fig. 10. Expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  em hepatócitos de rato nas condições de normóxia (A) e normóxia + infecção MOI 5 (B), 50 (C) e 500 (D). Os núcleos celulares estão corados com DAPI (A1, B1, C1 e D1).

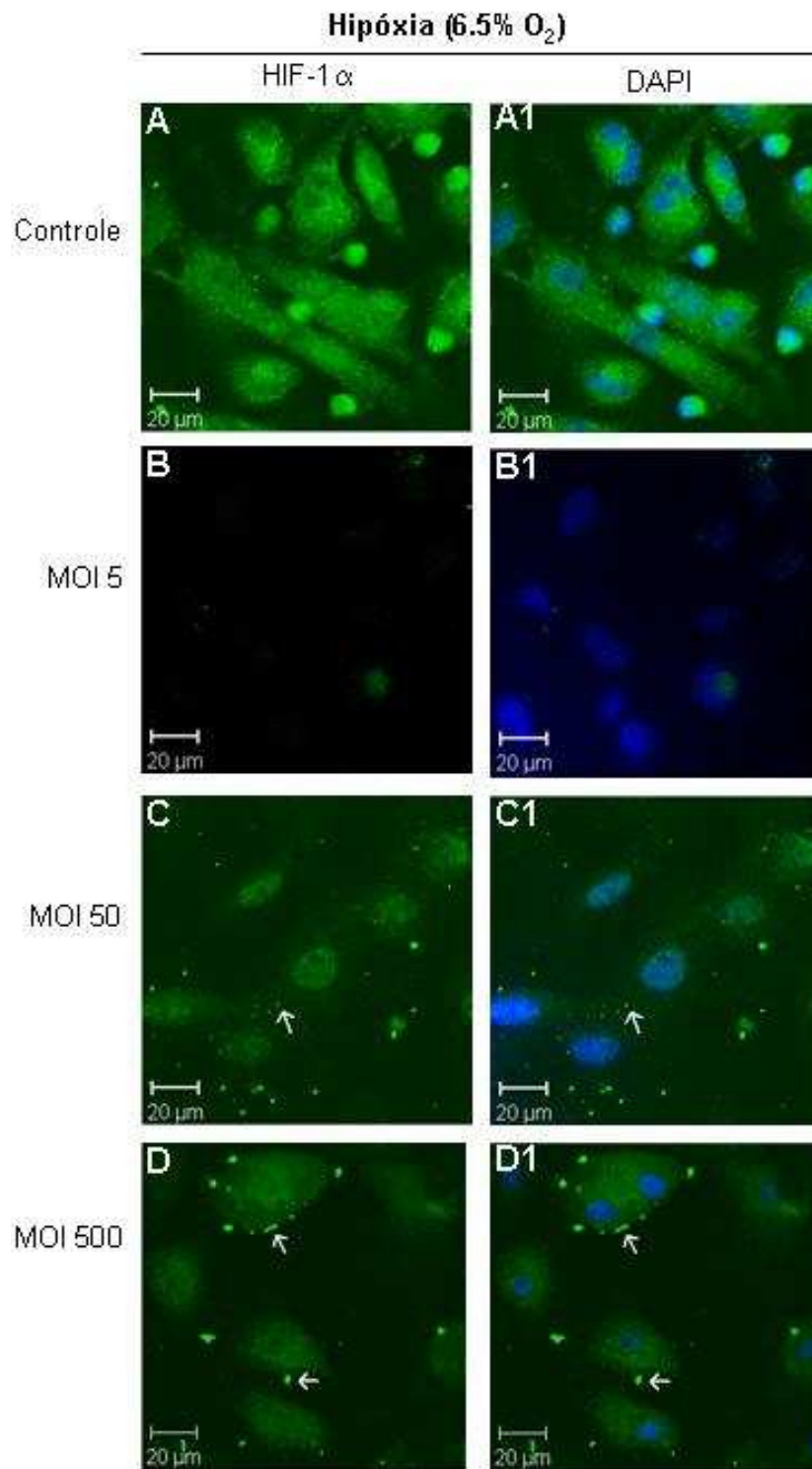


Fig. 11. Expressão do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  em hepatócitos de rato nas condições de hipóxia (A) e hipóxia + infecção MOI 5 (B), 50 (C) e 500 (D). Os núcleos celulares estão corados com DAPI (A1, B1, C1 e D1).

## 5. DISCUSSÃO

A técnica da retirada prévia de oxigênio do meio de cultura pelo método de borbulhamento de nitrogênio molecular ( $N_2$ ) mostrou-se eficiente para que uma menor taxa de  $pO_2$  fosse alcançada nas culturas. A redução de  $pO_2$  atingida foi considerada ideal para os nossos ensaios, seguindo experiência prévia do nosso laboratório (Andrade Júnior. et al., 2009). A concentração de oxigênio no sobrenadante das culturas celulares ao final de 24 horas, correspondeu a 43.2 mmHg (6.5% $O_2$ ). Este grau de hipóxia foi semelhante ao atingido em outros estudos (Veltman et al., 1987).

Observamos que o meio de cultura em contato com os hepatócitos em normóxia, por 24 horas, apresenta redução de aproximadamente 25% do oxigênio quando comparado ao meio controle sem contato com os hepatócitos. Esta porcentagem corresponde provavelmente ao oxigênio consumido pelas células no seu processo normal de respiração. Entretanto, em microambiente hipóxico por 24 horas, os hepatócitos consumiram apenas 8.6% do oxigênio presente, quando comparado à concentração de oxigênio no meio controle. Este resultado sugere que os hepatócitos podem se adaptar à hipóxia consumindo menos oxigênio, talvez diminuindo a sua atividade metabólica e a demanda de  $O_2$  durante tais períodos. Este fenômeno pode envolver a diminuição ou inibição da função mitocondrial, gerando uma resposta que alteraria a susceptibilidade do hepatócito ao estresse fisiológico na hipóxia (Schumacker et al., 1993).



A diminuição da demanda de oxigênio pode ocorrer através da redução das principais vias de consumo de ATP, como transporte de íons e síntese de proteínas (Heerlein et al., 2005). Desta forma, além de consumir menos oxigênio, os hepatócitos tendem a diminuir suas principais funções vitais a fim de suportar a baixa disponibilidade de oxigênio que ocorre na condição hipóxica (Subramanian et al., 2007).

Convém salientar que o oxigênio difunde-se facilmente no meio de cultura, podendo haver rápida elevação da concentração desse gás na amostra caso não seja mantido em ambiente controlado (Malda et al., 2007).

Em relação à recuperação de bactérias intracelulares, nossos resultados mostraram que houve menor tendência à infecção de hepatócitos de rato por *S. flexneri* quando as células foram submetidas à hipóxia por 24 horas. Este fenômeno foi relatado com outros microrganismos intracelulares, como *Chlamydia trachomatis* e *Leishmania amazonensis*, em outros tipos celulares (Colhone et al., 2004, Roth et al., 2010). A invasão bacteriana também pareceu se comportar de forma MOI-dependente, aumentando com o aumento da multiplicidade de infecção.

Podemos especular que a diminuição da invasão bacteriana em hepatócitos submetidos à hipóxia seria ocasionada pelas mudanças fisiológicas e morfológicas sofridas pelas células nesta condição, conforme observado por nosso grupo ao longo do projeto. Marteyn et al. (2010) demonstrou que a superfície epitelial do trato gastrointestinal possui um suprimento de oxigênio maior do que o lúmen intestinal, devido a maior irrigação sanguínea. O grupo também demonstrou que *S. flexneri* possui a

habilidade de detectar variadas tensões de oxigênio, o que permitiria a ativação do sistema de secreção do tipo III (T3SS) em local preciso, permitindo a invasão e virulência principalmente em tecidos irrigados mais favoráveis ao crescimento e nutrição bacteriana. Desta forma, as alterações celulares sofridas pelos hepatócitos em hipóxia poderiam ser reconhecidas por *S. flexneri* que então não ativaria seu sistema de secreção para invadir as células. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não foram descritos e necessitam de mais estudos para serem elucidados.

Hepatócitos submetidos à hipóxia por 24 horas não tiveram a porcentagem de viabilidade reduzida, quando comparado com os hepatócitos que permaneceram em normóxia. Este resultado sugere que o tempo de exposição à hipóxia utilizado em nosso estudo (24 horas) e a concentração de oxigênio (6.5%) não influenciaram a viabilidade dos hepatócitos de forma significativa. Este fenômeno foi também observado por outros autores (Schieble et al., 1988, Khan et al., 2006). A preservação da viabilidade celular na condição de hipóxia, mesmo após invasão bacteriana, permitiu que o nosso estudo fosse realizado e os objetivos fossem alcançados. Além disso, a preservação da viabilidade nos grupos experimentais permitiu a validação de nosso modelo de estudo no sentido de induzir a célula a responder à injúria por mecanismos diferenciados, independentes da morte celular.

Pudemos observar uma aparente correlação entre o número de bactérias incubadas com os hepatócitos e a intensidade das alterações

morfológicas, tanto em normóxia quanto em hipóxia. Na multiplicidade de infecção 5 (MOI 5) as células apresentaram poucas alterações, quando comparadas com a multiplicidade de infecção 500 (MOI 500). Estes resultados mostram a fragilidade dos hepatócitos frente ao ambiente hipóxico utilizado em nossos experimentos (6.5% O<sub>2</sub>), somado com a infecção por *S. flexneri*.

Células de linhagens tumorais aparentam ser mais resistentes à hipóxia, suportando tensões abaixo de 1% de oxigênio sem grandes alterações morfológicas e de viabilidade (Lluis et al., 2006). Apesar de não ser uma linhagem celular estabelecida, os hepatócitos também suportaram um tempo prolongado de exposição à baixa tensão de oxigênio (24 horas) sem apresentar perda significativa da viabilidade, embora desenvolvendo alterações morfológicas significativas. A hipóxia somada à infecção bacteriana mostrou agravar morfolologicamente a injúria dos hepatócitos, como mostrado na análise morfológica das células.

Nossos resultados mostraram que a liberação de TNF- $\alpha$  não foi alterada de forma significativa em hepatócitos submetidos à hipóxia em comparação às células em normóxia. Podemos especular que o TNF- $\alpha$  estaria sendo produzido, mas talvez fosse rapidamente degradado por via lisossomal antes de sua liberação, como já demonstrado em macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à hipóxia (Lahat et al., 2008). Outra hipótese possível seria a supressão da transcrição gênica do RNAm da citocina em hipóxia, ocasionando produção semelhante a níveis normóxicos. Além disso, mudanças pós-transcricionais ocorridas em virtude da condição

hipóxica poderiam inativar a molécula de TNF- $\alpha$ , impedindo sua liberação para o meio extracelular (Lahat et al., 2008)

Alguns autores verificaram maior liberação de TNF- $\alpha$  em células submetidas à hipóxia do que células em normóxia, evidenciando aparentemente que não há um padrão único de produção e liberação desta citocina (Ghezzi et al., 1991, Guida et al., 1998). Contudo, a maior liberação de TNF- $\alpha$  por estímulos como LPS e infecção bacteriana intracelular é convergente na literatura, e também concordante com nossos resultados (Lahat et al., 2003, Santos et al., 2005). Nossos resultados também são semelhantes aos de outros autores obtidos com outros tipos celulares (Lahat et al., 2008), evidenciando que provavelmente a liberação de TNF- $\alpha$  depende do tipo celular e das condições ambientais às quais a célula estudada está submetida.

Estudo recente demonstrou que outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e IL-6 tiveram sua liberação reduzida em tecidos de explantes cocleares quando em situação de hipóxia (Khan et al., 2010), indicando, novamente, que o estímulo hipóxico pode ser capaz de inibir ou diminuir a liberação de TNF- $\alpha$  por diversos tipos celulares.

No caso de nossa célula de estudo, o hepatócito, existem trabalhos na literatura com resultados semelhantes aos nossos, mostrando a menor liberação de TNF- $\alpha$  por hepatócitos de ratos submetidos à hipóxia, quando infectados por bactérias gram negativas (Loftis et al., 2000).

Nossos dados sugerem que a infecção de hepatócitos por *S. flexneri*, após período de 24 horas em hipóxia, aumenta a liberação de TNF- $\alpha$  pelas

células em menor quantidade com relação à infecção em normóxia. Este fenômeno assume grande importância por sinalizar possível redução da resposta inflamatória hepática neste tipo de microambiente. Essas conclusões, no entanto, aguardam elucidação em futuros estudos.

A citotoxicidade celular avaliada pela produção e liberação de DHL foi significativamente maior no grupo de células submetidas à hipóxia em comparação com o grupo normóxico. Estes resultados estão de acordo com os de outros estudos realizados com hepatócitos humanos, cardiomiócitos e células mesenquimais (Tüzüner et al., 2004, Golan et al., 2011, Peterson et al., 2011).

Tanto na condição de normóxia + infecção como hipóxia + infecção a concentração bacteriana não foi determinante para o aumento ou diminuição da liberação de DHL, não havendo diferenças significativas nos resultados entre os grupos de infecção. É possível que a estabilidade da produção de DHL seja comprometida quando as células epiteliais estão em contato com endotoxinas bacterianas (Block et al., 1985).

Houve diferença significativa entre os grupos normóxia + infecção MOI 50 e Hipóxia + Infecção MOI 5 e 50, evidenciando uma tendência ao aumento de DHL nos grupos de hepatócitos infectados em hipóxia, em relação aos grupos em normóxia infectados. Podemos especular que a presença da bactéria aparentemente foi determinante para a diminuição dos níveis de citotoxicidade em relação aos grupos de células não infectadas sob hipóxia. Para testar essa hipótese, realizamos experimentos nos quais foi comparada a produção de DHL tanto em hepatócitos mantidos em hipóxia

por 24 horas, seguido de 1 hora de infecção por *S. flexneri*, quanto naqueles que após 24 horas de hipóxia eram mantidos em normóxia sem infecção também por 1 hora. Pudemos observar que a produção e a liberação de DHL foi igual nos dois casos (dados não mostrados), evidenciando que talvez no período de uma hora de infecção em normóxia possa ocorrer a degradação de DHL sem interferência bacteriana.

Desta forma, concluímos que em nosso modelo experimental de infecção, com 1 hora de infecção dos hepatócitos a 37 °C, nas MOIs 5, 50 e 500, não foi observada a liberação significativa de DHL pelas células quando comparada ao controle. Podemos especular que a liberação de DHL nessas condições poderia ocorrer ou com maior tempo de infecção, ou na presença de maior número de bactérias. Para auxiliar na compreensão deste fenômeno, realizamos experimentos para avaliar a produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato em normóxia ou hipóxia, infectados com *S. flexneri* por 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas, e então comparar os resultados com aqueles obtidos durante 1 hora de infecção (Apêndice 1 – Resultados complementares – DHL). Os resultados mostraram que após 15 horas de infecção na MOI 5 em normóxia, e 12 horas de infecção em hipóxia, os níveis de produção e liberação de DHL atingem cerca de 50%. Na MOI 50 após 15 horas de infecção em normóxia, e 12 horas de infecção em hipóxia, os níveis de produção e liberação de DHL atingem cerca de 75%, e na MOI 500 após esse mesmo período de infecção a citotoxicidade alcançada é de mais de 85%. Estes resultados complementares de DHL evidenciaram que *S. flexneri* é capaz de aumentar a produção e liberação dessa enzima em

relação ao controle, exigindo porém um tempo mais longo de infecção, de 15 horas em normóxia e de 12 horas em hipóxia (Apêndice 1 – Resultados complementares – DHL).

Hepatócitos de rato submetidos à hipóxia tiveram maiores taxas de apoptose quando comparados com as células em normóxia. Esse fenômeno também foi observado em outros estudos (Riva et al., 1998, Crenesse et al., 2000). A infecção por *S. flexneri* aumentou as taxas de apoptose significativamente nos hepatócitos tanto em normóxia quanto em hipóxia. Hepatócitos infectados com outras bactérias tiveram taxas de apoptose similares (Delpino et al., 2010). Contudo, aparentemente a hipóxia não teve um efeito sinérgico com *S. flexneri*, pois não houve diferença significativa nas taxas de apoptose entre os grupos de infecção em normóxia e hipóxia.

Além disso, as taxas de apoptose não aumentaram com o aumento da MOI, evidenciando que a quantidade de apoptose parece atingir um nível máximo em 1 hora de infecção, que independe da variação nas concentrações bacterianas.

Como a apoptose pode ser estimulada por diferentes vias, nós especulamos que no caso do grupo experimental de hipóxia ela pode não estar sendo ativada pela via do TNF- $\alpha$ , visto que essa citocina não teve sua liberação aumentada significativamente nesse grupo. Alternativamente, é conhecido que a hipóxia leva a formação de espécies reativas de oxigênio pelos hepatócitos, o que poderia induzir a morte celular por apoptose, como já descrito em hepatócitos humanos submetidos à hipóxia (Bhogal et al., 2010).

Já no caso dos grupos infectados, podemos especular que o aumento de TNF- $\alpha$  em hepatócitos infectados por *S. flexneri* em normóxia e hipóxia poderia estar relacionado às maiores taxas de apoptose nessa mesma condição experimental, e talvez nesses grupos a apoptose poderia estar sendo ativada pela via do TNF- $\alpha$ .

*S. flexneri* é bem conhecida por induzir apoptose em macrófagos (Zychlinsky et al., 1992, Nonaka et al., 2003). Os nossos resultados indicam que esta enterobactéria também é capaz de induzir apoptose em hepatócitos de rato, fenômeno ainda pouco conhecido.

A expressão de HIF-1 $\alpha$  foi observada nos hepatócitos em normóxia infectados nas MOIs 50 e 500, e em hepatócitos em hipóxia infectados nas MOIs 50 e 500. Observando a posição dos núcleos corados por DAPI, pudemos observar que o HIF-1 $\alpha$  está localizado no núcleo e no citoplasma dos hepatócitos. Este fato contrasta com o que poderíamos esperar de um fator de transcrição com atuação maior no núcleo das células. Contudo, outros trabalhos já evidenciaram esta tendência de localização de HIF-1 $\alpha$  no citoplasma (Burke et al., 2002, Arrais-Silva et al., 2005). Uma possível explicação para este fenômeno estaria na suposição que o HIF-1 $\alpha$  poderia sofrer ubiquitinação para posterior degradação proteossomal no citoplasma, sendo, desta forma, rapidamente translocado para fora do núcleo celular. Outra hipótese possível seria uma modificação conformacional sofrida pelo HIF-1 $\alpha$  no núcleo celular, o que diminuiria a sua imunoreatividade (Burke et al., 2002).



Apesar de ser um fator de transcrição tipicamente expresso em microambientes de hipóxia, os nossos resultados mostraram que o HIF-1 $\alpha$  foi expresso também em hepatócitos de rato infectados por *S. flexneri* em normóxia. Este fenômeno é pouco observado e confirma a hipótese de que microorganismos patogênicos intracelulares podem estimular a expressão de HIF-1 $\alpha$ , assim como já descrito com outros microorganismos em outros tipos celulares (Nakamura et al., 2009, Bhattacharyya et al., 2010).

É interessante notar que na MOI 5 não houve a expressão de HIF-1 $\alpha$ , tanto na condição normóxica quanto na condição hipóxica. Podemos especular que deve haver um número mínimo de bactérias para que ocorra a expressão desse fator.

As vias de sinalização para a expressão de HIF-1 $\alpha$  em hepatócitos infectados por *S. flexneri*, bem como a ativação da expressão gênica desencadeada por este fator ainda são pouco estudados. O melhor conhecimento sobre todos os papéis exercidos por este fator de transcrição poderá elucidar os mecanismos de patogenicidade e resposta celular nas infecções, revelando novos alvos com potenciais terapêuticos.

Em seu conjunto, os nossos resultados contribuem para um melhor conhecimento da interação entre os hepatócitos e a bactéria invasiva *S. flexneri*. O microambiente de hipóxia tão prevalente em várias doenças hepáticas parece influenciar significativamente a invasividade desta bactéria, bem como a produção de TNF- $\alpha$  pelos hepatócitos com reflexos também nas taxas de apoptose. Mais detalhes desta complexa interação aguardam futuros estudos para serem esclarecidos. Temos certeza de que este

conhecimento será essencial na melhoria das estratégias de combate contra este importante agente infeccioso.

## 6. CONCLUSÕES

1. *S. flexneri* invade hepatócitos de rato causando alterações morfológicas como a ruptura da monocamada celular, a formação de vacúolos e núcleos picnóticos. As alterações morfológicas dos hepatócitos são mais evidentes quanto maior a MOI utilizada.
2. O número de bactérias intracelulares recuperadas dos hepatócitos parece ser MOI-dependente, diminuindo na condição de hipóxia.
3. A liberação de TNF- $\alpha$  por hepatócitos de rato infectados por *S. flexneri* em normóxia e hipóxia aumentou significativamente em comparação ao controle normóxico e hipóxico.
4. Não houve variação significativa na liberação de TNF- $\alpha$  entre os grupos de infecção, contudo o grupo hipóxia + infecção apresentou redução na liberação da citocina em comparação com o grupo normóxia + infecção.
5. A produção de DHL é maior em hipóxia do que em todos os outros grupos estudados, não apresentando diferenças significativas entre os outros grupos.

6. As taxas de apoptose em hepatócitos de rato aumentam na condição de hipóxia, normóxia + infecção e hipóxia + infecção, quando comparadas ao controle normóxico.

7. HIF-1 $\alpha$  é expresso no núcleo e citoplasma de hepatócitos hipóxicos, infectados por *S. flexneri* em normóxia e hipóxia na MOI 50 e 500, sendo ausente em normóxia e em normóxia + infecção e hipóxia + infecção na MOI 5.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdala E, Baía CE, Mies S, Massarollo PC, de Paula Cavalheiro N, Baía VR, Inácio CA, Sef HC, Barone AA. Bacterial translocation during liver transplantation: a randomized trial comparing conventional with venovenous bypass vs. piggyback methods. *Liver Transpl.* 2007; 13:488-96.

Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res.* 2001; 61:6548–54.

Andrade Júnior DR, Andrade DR, Santos SA. Study of rat hepatocytes in primary culture submitted to hypoxia and reoxygenation: action of the cytoprotectors prostaglandin E1, superoxide dismutase, allopurinol and verapamil. *Arq Gastroenterol.* 2009; 46:333-40.

Arrais-Silva WW, Paffaro Jr VA, Yamada AT, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Exp Mol Pathology.* 2005; 78:49-54.

Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Hall EH, Mebrahtu ST, Ernst PB, Crowe SE. Mechanism of hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated Mcl1 regulation in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 299:1177-86.

Bhogal RH, Curbishley SM, Weston CJ, Adams DH, Afford SC. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation. *Liver Transpl*. 2010; 16:1303-13.

Bhogal RH, Weston CJ, Curbishley SM, Bhatt NA, Adams DH, Afford SC. Variable responses of small and large human hepatocytes to hypoxia and hypoxia/reoxygenation (H-R). *FEBS Lett*. 2011; 585:935-41.

Block ER, Patel JM, Sheridan NP. Effect of oxygen and endotoxin on lactate dehydrogenase release, 5-hydroxytryptamine uptake, and antioxidant enzyme activities in endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1985; 122:240-8.

Body-Malapel M, Dharancy S, Berrebi D, Louvet A, Hugot JP, Philpott DJ, Giovannini M, Chareyre F, Pages G, Gantier E, Girardin SE, Garcia I, Hudault S, Conti F, Sansonetti PJ, Chamaillard M, Desreumaux P, Dubuquoy L, Mathurin P. NOD2: a potential target for regulating liver injury. *Lab Invest*. 2008; 88:318-27.

Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol*. 1998; 275:387-92.

Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:1129-34.

Burke B, Tang N, Corke KP, Tazzyman D, Ameri K, Wells M, Lewis CE. Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *J Pathol*. 2002; 196:204-12.

Colhone MC, Arrais-Silva WW, Picoli C, Giorgio S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. *J Parasitol*. 2004; 90:510-5.

Cosgrove BD, Cheng C, Pritchard JR, Stolz DB, Lauffenburger DA, Griffith LG. An inducible autocrine cascade regulates rat hepatocyte proliferation and apoptosis responses to tumor necrosis factor-alpha. *Hepatology*. 2008; 48:276-88.

Crenesse D, Gugenheim J, Hornoy J, Tornieri K, Laurens M, Cambien B, Lenegrate G, Cursio R, De Souza G, Auberger P, Heurteaux C, Rossi B, Schmid-Alliana A. Protein kinase activation by warm and cold hypoxia-reoxygenation in primary-cultured rat hepatocytes-JNK(1)/SAPK(1) involvement in apoptosis. *Hepatology* 2000; 32:1029-36.

Degrossoli A, Bosetto MC, Lima CB, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. *Immunol Lett*. 2007; 114:119-25.

Delpino MV, Barrionuevo P, Scian R, Fossati CA, Baldi PC. *Brucella*-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses. *J Hepatol*. 2010; 53:145-54.

Dockrell DH. Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. *J Infect*. 2001, 42:227-234.

Dunn GD, Hayes P, Breen KJ, Schenker S. The liver in congestive heart failure: a review. *Am J Med Sci*. 1973; 265:174-189.

Dupont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J Infect Dis*. 1989; 159:1126-8.

Ebert EC. Hypoxic liver injury. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81:1232-6.

Fernandez-Prada CM, Hoover DL, Tall BD, Venkatesan MM. Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri in vitro* undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect Immun*. 1997; 65:1486–96.



Galán JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 1999; 284:1322-8.

Ghezzi P, Dinarello CA, Bianchi M, Rosandich ME, Repine JE, White CW. Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine*. 1991; 3:189-94.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zähringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003; 300:1584–7.

Golan O, Issan Y, Isak A, Leipziger J, Robaye B, Shainberg A. Extracellular nucleotide derivatives protect cardiomyocytes against hypoxic stress. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81:1219-27.

Goosney DL, Knoechel DG, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5:216-23.

Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, Wu Lee YH, Durkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *Embo J*. 1999; 18:3034-43.

Guida E, Stewart A. Influence of hypoxia and glucose deprivation on tumour necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in human cultured monocytes. *Cell Physiol Biochem*. 1998; 8:75-88.

Heerlein K, Schulze A, Hotz L, Bärtsch P, Mairbäurl H. Hypoxia decreases cellular ATP demand and inhibits mitochondrial respiration of a549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32:44-51.

Henrion J. Hypoxic hepatitis: the point of view of the clinician. *Acta Gastroenterol Belg*. 2007; 70:214-6.

Hoogsteen IJ, Marres HA, van der Kogel AJ, Kaanders JH. The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2007; 19:385-96.

Jennison AV, Verma NK. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004; 28:43-58.

Kempf VA, Lebedziejewski M, Alitalo K, Wälzlein JH, Eehalt U, Fiebig J, Huber S, Schütt B, Sander CA, Müller S, Grassl G, Yazdi AS, Brehm B, Autenrieth IB. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation*. 2005; 111:1054-62.

Khan M, Szczepek AJ, Haupt H, Olze H, Mazurek B. Expression of the proinflammatory cytokines in cochlear explant cultures: influence of normoxia and hypoxia. *Neurosci Lett*. 2010; 479:249-52.

Khan Z, Michalopoulos GK, Stolz DB. Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia-inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Pathol*. 2006; 169:1251-69.

Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15:2336-44.

Kondo S, Wang D, Mayumi T, Klein AS, Bulkley GB. Effect of hemorrhagic shock and resuscitation upon hepatic phagocytic clearance and killing of circulating microorganisms. *Shock*. 1996; 5:106-11.

Kotloff K L, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti P J, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ*. 1999; 77:651-66.

Lahat N, Rahat MA, Ballan M, Weiss-Cerem L, Engelmayer M, Bitterman H. Hypoxia reduces CD80 expression on monocytes but enhances their LPS-stimulated TNF- $\alpha$  secretion. *J Leukoc Biol*. 2003; 74:197-205.

Lahat N, Rahat MA, Kinarty A, Weiss-Cerem L, Pinchevski S, Bitterman H. Hypoxia enhances lysosomal TNF-alpha degradation in mouse peritoneal macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295:2-12.

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004; 36:1-12.

Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury.* 2007; 38:1336-45.

Levine MM, Dupont HL, Formal SB, Hornick RB, Takeuchi A, Gangarosa EJ, Snyder MJ, Libonati JP. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) dysentery. *J Infect Dis.* 1973; 127:261-70.

Lluis JM, Morales A, Blasco C, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Critical role of mitochondrial glutathione in the survival of hepatocytes during hypoxia. *J Biol Chem.* 2005; 280:3224-32.

Loftis LL, Johanns CA, Lechner AJ, Matuschak GM. Brief hypoxic stress suppresses postbacteremic NF-kappaB activation and TNF-alpha bioactivity in perfused liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279:99-108.

Ma Z, Wang S, Wang F, Wang P. An experimental study of the changes of rat hepatocytic glycolysis during hypoxia. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2002; 18:238-41.

Malda J, Klein TJ, Upton Z. The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng*. 2007; 13:2153-62.

Marteyn B, West NP, Browning DF, Cole JA, Shaw JG, Palm F, Mounier J, Prévost MC, Sansonetti P, Tang CM. Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature*. 2010; 465:355-8.

Martino MC, Rossi G, Tattoli I, Martini I, Chiavolini D, Cortese G, Pozzi G, Bernardini ML. Intravenous infection of virulent shigellae causes fulminant hepatitis in mice. *Cell Microbiol*. 2005; 7:115-27.

Melillo G. Hypoxia-inducible factor 1 inhibitors. *Methods Enzymol*. 2007; 435:385-402.

Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol*. 2005; 175:6257-263.

Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1alpha by human papillomaviruses. *Virology*. 2009; 387:442-8.

Navarre WW, Zychlinsky A. Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol*. 2000; 2:265-73.

Ndengele MM, Bellone CJ, Lechner AJ, Matuschak GM. Brief hypoxia differentially regulates LPS-induced IL-1beta and TNF-alpha gene transcription in RAW 264.7 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278:1289-96.

Niyogi, SK. Shigellosis. *J Microbiol*. 2005; 43:133-43.

Nonaka T, Kuwabara T, Mimuro H, Kuwae A, Imajoh-Ohmi S. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. *Microbiology*. 2003; 149:2513-27.

Perdomo OJ, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti PJ. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med*. 1994; 180:1307-19.

Peterson KM, Aly A, Lerman A, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. *Life Sci.* 2011; 88:65-73.

Phalipon A, Sansonetti PJ. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? *Immunol Cell Biol.* 2007; 85:119-29.

Philpott DJ, Edgeworth JD, Sansonetti PJ. The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from *in vitro* and *in vivo* studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2000; 355:575-86.

Piret J-P, Mottet D, Raes M, Michiels C. CoCl<sub>2</sub>, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann NY Acad Sci.* 2002; 973:443–7.

Raqib R, Lindberg AA, Wretling B, Bardhan PK, Andersson U, Andersson J. Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. *Infect Immun.* 1995; 63:289-96.

Riva C, Chauvin C, Pison C, Leverve X. Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis. *Anticancer Res.* 1998; 18:4729-36.

Roth A, König P, van Zandbergen G, Klinger M, Hellwig-Bürgel T, Däubener W, Bohlmann MK, Rupp J. Hypoxia abrogates antichlamydial properties of

IFN- $\gamma$  in human fallopian tube cells in vitro and ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:19502-7.

Rowell L, Eckmann L, Dwinell MB, Carpenter SP, Raucy JL, Yang SK, Kagnoff MF. Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation of bacterial invasion. *Am J Physiol*. 1997; 273:322-32.

Sansonetti PJ. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280:319-23.

Santos SA, Andrade DR, Andrade Júnior DR. Rat hepatocyte invasion by *Listeria monocytogenes* and analysis of TNF- $\alpha$  role in apoptosis. *Rev Inst Med Trop*. 2005; 47:73-80.

Schieble TM, Costa AK, Heffel DF, Trudell JR. Comparative toxicity of halothane, isoflurane, hypoxia, and phenobarbital induction in monolayer cultures of rat hepatocytes. *Anesthesiology*. 1988; 68:485-94.

Schumacker PT, Cain SM. The concept of a critical oxygen delivery. *Intensive Care Med*. 1987; 13:223-9.



Schumacker PT, Chandel N, Agusti AG. Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes. *Am J Physiol*. 1993; 265:395-402.

Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000; 88:1474–80.

Semenza GL. Life with oxygen. *Science*. 2007; 318:62-4.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:721-32.

Souza EC, Martinez MB, Taddei CR, Mukai L, Gilio AE, Racz ML, Silva L, Eizenberg B, Okay Y. Etiologic profile of acute diarrhea in children in São Paulo. *J Pediatr (Rio J)*. 2002; 78:31-8.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995; 267:1445–9.

Strassburg CP. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Shock liver. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003; 17:369-81.

Subramanian RM, Chandel N, Budinger GR, Schumacker PT. Hypoxic conformance of metabolism in primary rat hepatocytes: a model of hepatic hibernation. *Hepatology*. 2007; 45:455-64.

Taylor CT, Colgan SP. Hypoxia and gastrointestinal disease. *J Mol Med*. 2007; 85:1295-300.

Tüzüner E, Liu L, Shimada M, Yilmaz E, Glanemann M, Settmacher U, Langrehr JM, Jonas S, Neuhaus P, Nussler AK. Heme oxygenase-1 protects human hepatocytes in vitro against warm and cold hypoxia. *J Hepatol.* 2004; 41:764-72.

Veltman JC, Anders MW. Cytotoxicity of N, N-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea in hypoxic rat hepatocytes. *Cancer Res.* 1987; 47:5087-91.

von Seidlein L, Kim DR, Ali M, Lee H, Wang X, Thiem VD, Canh do G, Chaicumpa W, Agtini MD, Hossain A, Bhutta ZA, Mason C, Sethabutr O, Talukder K, Nair GB, Deen JL, Kotloff K, Clemens J. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med.* 2006; 3:353.

Walker RI, Owen RL. Intestinal barriers to bacteria and their toxins. *Annu Rev Med.* 1990; 41:393-400.

Wride MA, Sanders EJ. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat Embryol (Berl).* 1995; 191:1–10.

Wu XZ, Xie GR, Chen D. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22:1178-82.

Yang J, Chen L, Yu J, Sun L, Jin Q. ShiBASE: an integrated database for comparative genomics of *Shigella*. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34:398-401.

Zeile WL, Purich DL, Southwick FS. Recognition of two classes of oligoproline sequences in profilin-mediated acceleration of actin-based *Shigella* motility. *J Cell Biol.* 1996; 133:49-59.

Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature.* 1992; 358:167-9.

## APÊNDICE 1 – RESULTADOS COMPLEMENTARES – DHL

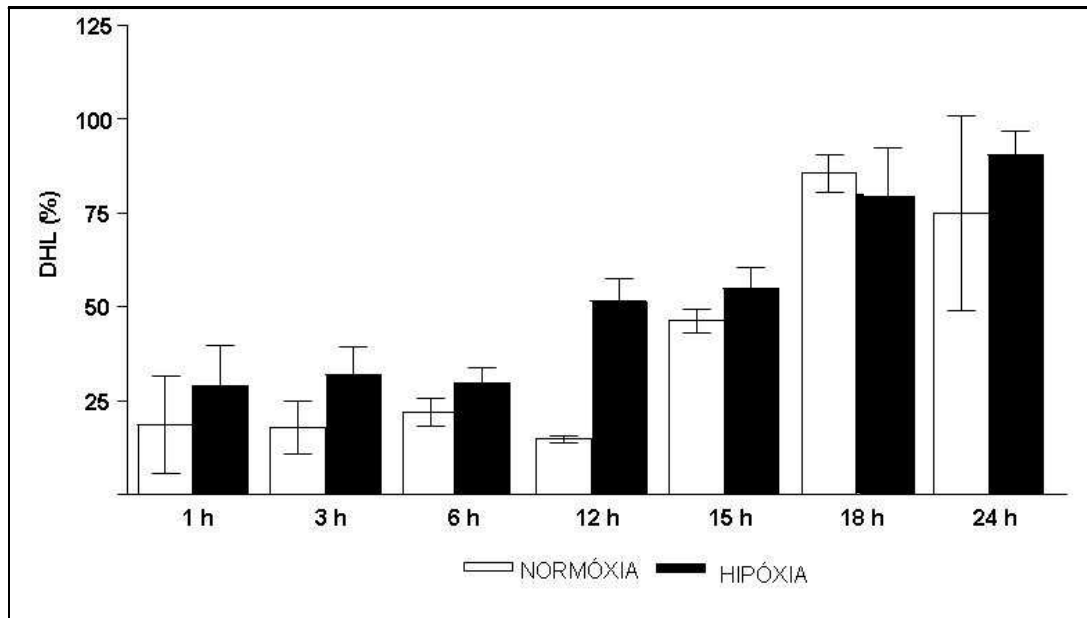


Fig. 1. Produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato previamente incubados por 24 horas em normóxia ou hipóxia e a seguir infectados por 1, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas com *S. flexneri* na MOI 5.

Tabela 1. Produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato previamente incubados por 24 horas em normóxia ou hipóxia e a seguir infectados por 1, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas com *S. flexneri* na MOI 5.

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>N (MOI 5) 1h</b>	33	18.55	12.81
<b>N (MOI 5) 3h</b>	14	17.92	7.02
<b>N (MOI 5) 6h</b>	5	21.93	3.74
<b>N (MOI 5) 12h</b>	5	14.71	0.79
<b>N (MOI 5) 15h</b>	4	46.30	3.08
<b>N (MOI 5) 18h</b>	4	85.66	5.04
<b>N (MOI 5) 24h</b>	4	75.07	25.94
<b>H (MOI 5) 1h</b>	28	28.97	10.61
<b>H (MOI 5) 3h</b>	9	31.93	7.22
<b>H (MOI 5) 6h</b>	4	29.65	4.31
<b>H (MOI 5) 12h</b>	4	51.50	5.87
<b>H (MOI 5) 15h</b>	4	54.90	5.52
<b>H (MOI 5) 18h</b>	4	79.27	13.03
<b>H (MOI 5) 24h</b>	4	90.40	6.42

Nota: aplicado teste de Student Newman-Keuls

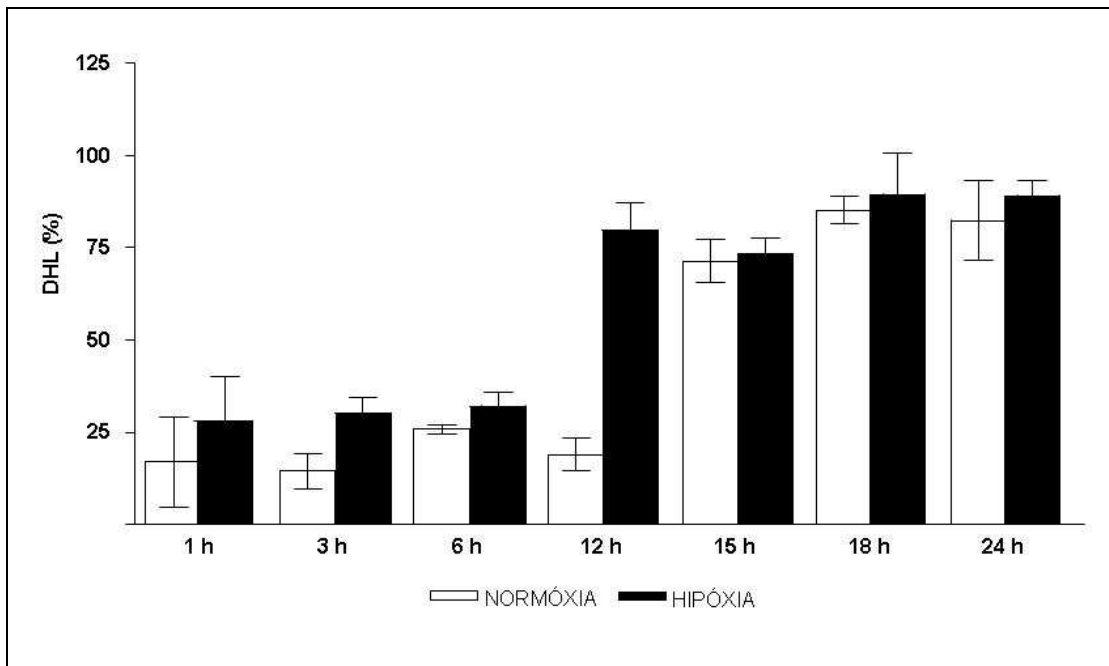


Fig. 2. Produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato previamente incubados por 24 horas em normóxia ou hipóxia e a seguir infectados por 1, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas com *S. flexneri* na MOI 50.

Tabela 2. Produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato previamente incubados por 24 horas em normóxia ou hipóxia e a seguir infectados por 1, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas com *S. flexneri* na MOI 50.

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>N (MOI 50) 1h</b>	33	16.91	12.39
<b>N (MOI 50) 3h</b>	13	14.41	4.82
<b>N (MOI 50) 6h</b>	5	25.91	1.23
<b>N (MOI 50) 12h</b>	5	18.98	4.30
<b>N (MOI 50) 15h</b>	4	71.35	5.86
<b>N (MOI 50) 18h</b>	4	85.22	3.67
<b>N (MOI 50) 24h</b>	4	82.48	10.72
<b>H (MOI 50) 1h</b>	28	28.04	11.97
<b>H (MOI 50) 3h</b>	8	30.11	4.19
<b>H (MOI 50) 6h</b>	4	32.13	3.70
<b>H (MOI 50) 12h</b>	4	79.78	7.48
<b>H (MOI 50) 15h</b>	4	73.48	4.28
<b>H (MOI 50) 18h</b>	4	95.86	3.48
<b>H (MOI 50) 24h</b>	4	89.20	4.10

Nota: aplicado teste de Student Newman-Keuls

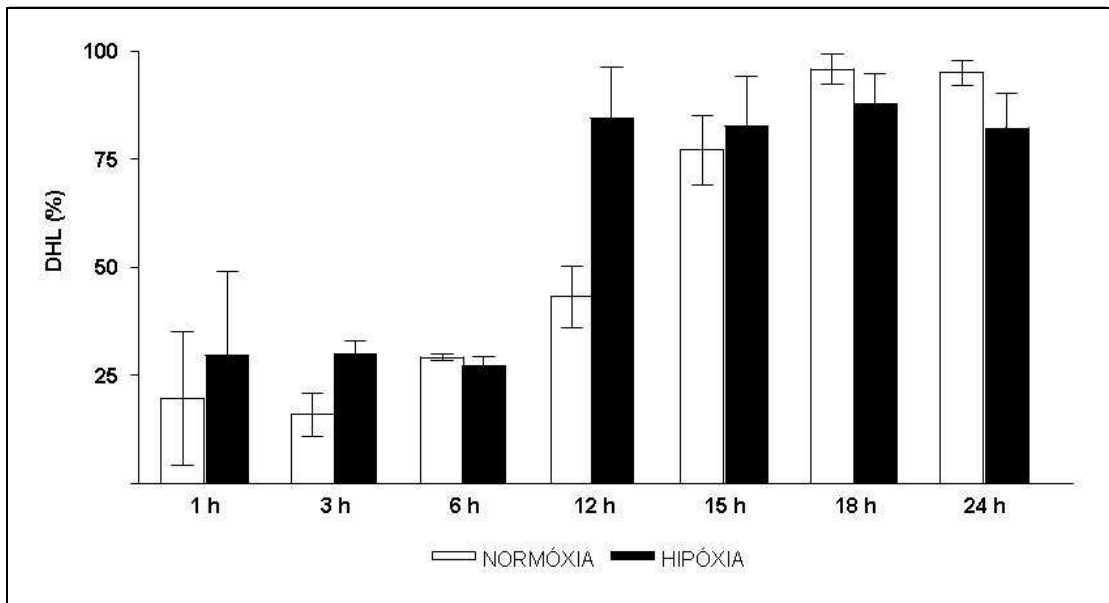


Fig. 3. Produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato previamente incubados por 24 horas em normóxia ou hipóxia e a seguir infectados por 1, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas com *S. flexneri* na MOI 500.



Tabela 3. Produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato previamente incubados por 24 horas em normóxia ou hipóxia e a seguir infectados por 1, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas com *S. flexneri* na MOI 500.

<b>Grupos</b>	<b>N</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>N (MOI 500) 1h</b>	34	19.61	15.44
<b>N (MOI 500) 3h</b>	13	15.94	4.99
<b>N (MOI 500) 6h</b>	5	29.21	0.82
<b>N (MOI 500) 12h</b>	5	43.32	7.12
<b>N (MOI 500) 15h</b>	4	77.13	7.95
<b>N (MOI 500) 18h</b>	4	89.60	11.18
<b>N (MOI 500) 24h</b>	4	95	2.95
<b>H (MOI 500) 1h</b>	28	29.67	19.36
<b>H (MOI 500) 3h</b>	8	30	2.88
<b>H (MOI 500) 6h</b>	4	27.20	2.28
<b>H (MOI 500) 12h</b>	4	84.40	11.96
<b>H (MOI 500) 15h</b>	4	82.58	11.61
<b>H (MOI 500) 18h</b>	4	87.85	7.05
<b>H (MOI 500) 24h</b>	4	82.27	7.86

Nota: aplicado teste de Student Newman-Keuls

Tabela 4. Produção e liberação de DHL em hepatócitos de rato previamente incubados por 24 horas em normóxia (N) ou hipóxia (H) e a seguir infectados por 1, 3, 6, 12, 15, 18 e 24 horas com *S. flexneri* nas MOIs 5, 50 e 500. Resultados significativos.

<b>GRUPOS</b>	<b>MOI 5</b>	<b>MOI 50</b>	<b>MOI 500</b>
N (1h) x N (3h)	NS	NS	NS
N (1h) x N (6h)	NS	NS	NS
N (1h) x N (12h)	NS	NS	NS
N (1h) x N (15h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (1h) x N (18h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (1h) x N (24h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (3h) x N (6h)	NS	NS	NS
N (3h) x N (12h)	NS	NS	$P \leq 0.05$
N (3h) x N (15h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (3h) x N (18h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (3h) x N (24h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (6h) x N (12h)	NS	NS	NS
N (6h) x N (15h)	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (6h) x N (18h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (6h) x N (24h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (12h) x N (15h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (12h) x N (18h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (12h) x N (24h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N (15h) x N (18h)	$P \leq 0.05$	NS	NS
N (15h) x N (24h)	$P \leq 0.05$	NS	NS
N (18h) x N (24h)	NS	NS	NS
H (1h) x H (3h)	NS	NS	NS
H (1h) x H (6h)	NS	NS	NS
H (1h) x H (12h)	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (1h) x H (15h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$

H (1h) x H (18h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (1h) x H (24h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (3h) x H (6h)	NS	NS	NS
H (3h) x H (12h)	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (3h) x H (15h)	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (3h) x H (18h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (3h) x H (24h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (6h) x H (12h)	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (6h) x H (15h)	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (6h) x H (18h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (6h) x H (24h)	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
H (12h) x H (15h)	NS	NS	NS
H (12h) x H (18h)	$P \leq 0.05$	NS	NS
H (12h) x H (24h)	$P \leq 0.05$	NS	NS
H (15h) x H (18h)	$P \leq 0.05$	NS	NS
H (15h) x H (24h)	$P \leq 0.05$	NS	NS
N (18h) x N (24h)	NS	NS	NS
N (1h) x N (1h)	NS	NS	NS
N (1h) x H (3h)	NS	NS	NS
N (1h) x H (6h)	NS	NS	NS

---

Nota: NS = não significativo

## APÊNDICE 2 – TABELA ESTATÍSTICA

GRUPOS	Recuperação Bactérias <sup>2</sup>	Viabilidade <sup>1</sup>	TNF- $\alpha$ <sup>1</sup>	DHL <sup>1</sup>	Apoptose <sup>2</sup>
N x H	-	NS	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N x N5	-	NS	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$
N x N50	-	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$
N x N500	-	NS	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$
N x H5	-	NS	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$
N x H50	-	NS	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$
N x H500	-	NS	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$
H x N5	-	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	NS
H x N50	-	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	NS
H x N500	-	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	NS
H x H5	-	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	NS
H x H50	-	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	NS
H x H500	-	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	NS
N5 x H5	NS	NS	$P \leq 0.05$	NS	NS
N5 x H50	NS	NS	NS	NS	NS
N5 x H500	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$
N50 x H5	NS	NS	$P \leq 0.05$	$P \leq 0.05$	NS
N50 x H50	NS	NS	NS	$P \leq 0.05$	NS
N50 x H500	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$	NS	NS
N500 x H5	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$	NS	NS
N500 x H50	$P \leq 0.05$	NS	NS	NS	NS
N500 X H500	$P \leq 0.05$	NS	$P \leq 0.05$	NS	NS
N5 x N50	NS	NS	NS	NS	NS
N5 x N500	$P \leq 0.05$	NS	NS	NS	NS
N50 x N500	$P \leq 0.05$	NS	NS	NS	NS
H5 x H50	NS	NS	NS	NS	NS
H5 x H500	$P \leq 0.05$	NS	NS	NS	NS
H50 x H500	$P \leq 0.05$	NS	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Aplicado teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn

<sup>2</sup> Aplicado teste de Student-Newman Keuls

N = Normóxia, H = Hipóxia, N5 = Normóxia MOI 5, N50 = Normóxia MOI 50, N500 = Normóxia MOI 500, H5 = Hipóxia MOI 5, H 50 = Hipóxia MOI 50, H500 = Hipóxia MOI 500, NS= não significativo.