

MAISA SUELEN DE OLIVEIRA SILVA

**INFECÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS
COM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *TRYPANOSOMA
CRUZI*: ANÁLISE DA AÇÃO DO FATOR DE NECROSE
TUMORAL**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Fevereiro/2016

MAISA SUELEN DE OLIVEIRA SILVA

**INFECÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS
COM DIFERENTES POPULAÇÕES DE
TRYPANOSOMA CRUZI: ANÁLISE DA AÇÃO DO
FATOR DE NECROSE TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Elizabeth Ribeiro da Silva

Co-orientadora: Dra. Vanessa Cabreira de Freitas

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Fevereiro/2016

EPÍGRAFE

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me sustentou durante todo este período e que me revestiu com sabedoria e com fé. A Ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais, Vera e Expedito, pelo apoio incondicional aos meus estudos, por todo cuidado e principalmente por suas orações.

Ao meu noivo Danilo pelo companheirismo e compreensão, estando sempre ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus queridos avós, que sempre com tanto carinho me acompanharam nessa jornada.

A Dona Áurea, que abriu as portas de seu lar para que pudesse estudar e que tornou uma amiga. Obrigada por ser essa pessoa tão especial que Deus, sem dúvidas, colocou em meu caminho.

A amiga Rosiane pelo incentivo. Aos amigos do Laboratório Conceição Machado em especial ao Reinaldo e Sara que colaboraram durante esse período com os procedimentos de cultivo celular.

A orientadora prof^ª. Elizabeth Ribeiro, por ter aberto as portas da UFMG e acreditado em meu potencial. Por todo conhecimento dispensado sobre Doença de Chagas, entre tantos outros. Muito obrigada.

A co-orientadora Vanessa Freitas, por todo aprendizado em cultivo de células e pela amizade.

A prof^ª. Patrícia e demais professores do Laboratório Conceição Machado.

Ao prof. Aristóbolo e prof. Eagler que sempre se dispuseram a colaborar com nossos trabalhos.

Aos funcionários do Centro de Microscopia da UFMG pelo profissionalismo e agilidade.

A CAPES e a sociedade brasileira que financiaram meus estudos.

A direção do Hospital Evangélico, em especial ao Giovan, que sempre me incentivou na conclusão dessa etapa.

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é capaz de infectar todos os tipos celulares de mamíferos. A infecção é um processo dependente de diversos fatores como as glicoproteínas presentes na superfície do parasito e da célula-alvo, a população de *T. cruzi* e a sinalização celular desencadeada pela interação parasito-célula-alvo. Sabe-se que, em modelos experimentais, o perfil anatomopatológico e imunológico da infecção depende da população de *T. cruzi*.

Neste trabalho propusemo-nos a analisar se a citocina pró-inflamatória TNF-alfa exerce efeito sobre a infecção de células epiteliais por tripomastigotas de clones de *T. cruzi*, pertencentes a DTU (Discret Typing Units) distintas. Também investigamos se as células infectadas mostram alguma alteração ultraestrutural no período de 22 horas de infecção.

Nossos resultados mostram que células epiteliais LLC-MK2 e HEK293 são mais susceptíveis à infecção pelo clone Col1.7G2 pertencente a DTU/TCI, quando comparadas com a infecção pelo clone CL-Brener pertencente a TCVI. Em relação ao clone CL-Brener, as células HEK293 são mais susceptíveis à infecção que as células LLC-MK2. Nossos dados mostram também que, ao contrário do descrito anteriormente para a cepa Y, o TNF-alfa não exerce efeito sobre a proporção de células infectadas e sobre o número de amastigotas intracelulares nos tipos celulares estudados.

De modo interessante, a análise em microscopia eletrônica de transmissão indica que as mitocôndrias das células epiteliais tendem a se acumular ao redor do parasito, muitas vezes se justapondo à sua membrana plasmática, no período de 22 horas de infecção.

Estes dados demonstram a complexidade do processo de invasão, que se mostrou dependente do tipo celular e da população do parasito utilizada. Desse modo, torna-se importante a continuidade de estudos para detecção de moléculas envolvidas neste processo, bem como o envolvimento de mitocôndrias no processo de infecção e permanência do parasito na célula hospedeira.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is able to enter into all cell types of mammalian cells. The infection is a process dependent on various factors such as the glycoproteins present on the surface of the parasite and the target cell, the population of *T. cruzi* and cell signaling triggered by parasite-target cell interaction. It is known that, in experimental models, the pathological and immunological profile of the infection depends on the population of *T. cruzi*.

In this work, we aimed to examine whether the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha has an effect on epithelial cell invasion by trypomastigotes of two populations of *T. cruzi* belonging to different DTU (Discrete Typing Units). We have also investigated whether the infected cells show any ultrastructural changes after 22 hours of infection.

Our results show that epithelial LLC-MK2 cells and HEK293 cells are more susceptible to infection by Col1.7G2 clone, which belongs to the DTU/TCI class compared with infection by clone CL-Brener, which belongs to TCVI. In relation to clone CL-Brener, HEK293 cells are more susceptible to infection than the LLC-MK2 cells. Our data also show that, contrary to the previously findings with strain Y, TNF-alpha had no effect on the proportions of infected cells and the number of intracellular parasites in both cell types studied.

Interestingly, analysis by transmission electron microscopy indicates that mitochondria of epithelial cells tend to accumulate around the parasite, often in close juxtaposition to its plasma membrane, during the period of 22 hours of infection.

These data demonstrate the complexity of the invasion process, which proved to be dependent on the cell type and the population of the parasite. Thus, further studies will be important for clarify the molecules involved in this process as well as the involvement of mitochondria in the infection and maintenance of the parasite in the host cell.

SUMÁRIO

1	Introdução	12
1.1	<i>Epidemiologia, transmissão e aspectos clínicos da doença de Chagas</i>	12
1.2	<i>Interação do Trypanosoma cruzi com a célula hospedeira</i>	15
2	Justificativa	23
3	Objetivos	25
4	Material e Métodos	26
4.1	<i>Obtenção, manutenção e plaqueamento de LLC-MK2 e HEK-293</i>	26
4.2	<i>Obtenção e manutenção dos clones Col1.7G2 e CL-Brener de Trypanosoma cruzi</i>	26
4.3	<i>Tratamento de LLC-MK2 e HEK293 com TNF-alfa</i>	28
4.4	<i>Infeção de LLC-MK2 e HEK93 com os clones Col1.7G2 e CL-Brener de Trypanosoma cruzi</i>	28
4.5	<i>Contagem de parasitos em microscopia de fluorescência</i>	29
4.6	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão</i>	30
4.7	<i>Viabilidade celular</i>	30
4.8	<i>Estatística</i>	31
5	Resultados	32
5.1	<i>Infeção de LLC-MK2 e HEK293 pelo clone Col1.7G2</i>	32
5.2	<i>Efeito do pré-tratamento com TNF-alfa sobre a infecção de LLC-MK2 e HEK-293 pelo clone Col1.7G2</i>	35
5.3	<i>Efeito do pré-tratamento com TNF-alfa sobre a infecção de LLC-MK2 e HEK-293 com o clone CL-Brener</i>	40
5.4	<i>Infeção de LLC-MK2 pelos clones CL Brener e Col1.7G2</i>	45
5.5	<i>Infeção de HEK293 pelos clones CL Brener e Col1.7G2</i>	49
5.8	<i>Ultraestrutura de LLC-MK2 infectadas com os clones CL Brener ou Col1.7G2</i>	50
6.	Discussão e Conclusões	68
7.	Referências	77

LISTA DE ABREVEATURAS

Caco-2 - colorectal adenocarcinoma epithelial cells

DAPI - 4,6-diamidino-2-phenylindol

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

DTUs - Discrete Typing Units

HEK293 - Human Embryonic Kidney cell line

IFN-gamma – Interferon-gamma

IL - Interleukin

FBS – Fetal Bovine Serum

HLA-DR - (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related)

LLC-MK2 - Monkey Kidney Epithelial cells line

PBS – Phosphate Buffer Saline

TC - *Trypanosoma cruzi*

TcSMP (Trypanosoma cruzi Surface Membrane Proteins)

TNF – Tumor Necroses Factor

Verificar glicoproteínas de T cruzi

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIÇÃO	PÁGINA
1	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .	12
2	Síntese esquemática de moléculas envolvidas na interação de <i>T. cruzi</i> com a célula hospedeira.	19
3	Modelo de invasão de <i>T. cruzi</i> mediado por lesão e reparo da membrana celular ou por eventos de sinalização.	20
4	Porcentagem de células infectadas com o clone Col1.7G2 na proporções de 10 parasitos/célula.	33
5	Tripomastigotas em LLC-MK2 infectadas pelo clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/célula.	33
6	Amastigotas em LLC-MK2 infectadas com clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/célula.	33
7	Porcentagem de células HEK293 infectadas e número de amastigotas em 100 células.	34
8	HEK293 infectadas com clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/célula e analisadas 2 e 22 horas após a infecção.	34
9	HEK 293 submetidas ao estímulo de 8 horas por TNF-alfa utilizados nos experimentos TNF 1 (Verm.) e TNF 2 (Azul).	35
10	HEK-293 infectadas com clone COL.17G2 na proporção de 10 parasitos/célula por célula, 2 e 22 horas após a infecção.	37
11	Número de amastigotas em 100 células LLC-MK2 ou HEK-293 infectadas com clone COL.17G2 na proporção de 10 parasitos/célula, 2 e 22 horas após a infecção.	38
12	Percentual de células LLC-MK2 ou HEK 293 infectadas com o clone Col1.7G2 e número de amastigotas em 100 células, 2 e 22 horas após a infecção, tratadas ou não com 20ng/ml de TNF-alfa por 6 horas.	38
13	A) Porcentagem de células infectadas e (B) Número de amastigotas em 100 células em HEK-293 sem ou após o pré tratamento com TNF-alfa e infectadas com clone Y na proporção de 10:1 parasitos/célula, 2 e 22 horas após a infecção ($p \geq 0,05$. One way ANOVA).	40
14	Porcentagem de LLC-MK2 ou HEK-293 infectadas	41

	com clone CL Brener na proporção de 10 parasitos /célula, 2 e 22 horas após a infecção.	
15	Número de amastigotas em 100 células LLC-MK2 ou HEK-293 infectadas pelo clone CL Brener na proporção de 10 parasitos/célula, 2 e 22 horas após a infecção.	42
16	Porcentagem de infecção e número de amastigotas em células LLC-MK2 ou HEK 293 infectadas pelo clone CL Brener, 2 e 22 horas após infecção sem tratamento ou com tratamento de 20ng/mL de TNF-alfa.	44
17	Células LLC-MK2 ou HEK293 infectadas apresentam padrões de infecção diferentes para o clone CL Brener.	44
18	LLC-MK2 infectadas com os clones CL Brener ou Col1.7G2.	49
19	HEK293 infectadas com os clones CL Brener ou Col1.7G2.	50
20	Imagens representativas de células LLC-MK2 controles, não tratadas com TNF e não infectadas com <i>T. cruzi</i> .	52
21	Imagens representativas de células LLC-MK2 controles tratadas com TNF por 6 horas.	54
22	Imagens representativas de células LLC-MK2 infectadas com o clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> .	56
23	Imagens representativas de células LLC-MK2 tratadas com TNF por seis horas e infectadas com o clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> .	58
24	Imagens representativas de células LLC-MK2 controles, não tratadas com TNF e não infectadas com <i>T. cruzi</i> .	60
25	Imagens representativas de células LLC-MK2 controles tratadas com TNF por 6 horas.	61
26	As imagens correspondem ao período de 22 horas de infecção com o clone Col1.7G2 de <i>T. cruzi</i> .	62
28	As imagens correspondem ao período de 22 horas de infecção com o clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i> . Ocorre acúmulo de perfis mitocondriais próximo ao parasito.	63
29	Imagens representativas de células LLC-MK2 tratadas com TNF por 6 horas e infectadas com o clone Col1.7g2 de <i>T. cruzi</i> . As mitocôndrias cumulavam-se próximas ao parasito e apresentavam-se justapostas à membrana plasmática do parasito.	64 e 65

<p>30</p>	<p>Imagens representativas de células LLC-MK2 tratadas com TNF por 6 horas e infectadas com o clone CL-Brener de <i>T. cruzi</i>. As imagens correspondem ao período de 22 horas de infecção. Mitocôndrias próximas ao parasito.</p>	<p>66</p>
<p>31</p>	<p>Imagens representativas de células LLC-MK2: (A) sem pré tratamento com TNF-alfa e sem infecção com <i>T. cruzi</i>, (B) pré tratadas com TNF-alfa e sem infecção com <i>T. cruzi</i>. (C) sem pré tratamento com TNF-alfa e infectadas com o clone Col1.7G2 (D) pré tratadas com TNF-alfa e infectadas com o clone Col1.7G2 (E) sem tratamento com TNF-alfa e infectadas com o clone CL Brener. (m) representa mitocôndrias próximas à superfície do parasito.</p>	<p>68</p>

1 Introdução

1.1 Epidemiologia, transmissão e aspectos clínicos da doença de Chagas

A doença de Chagas afeta cerca de 10 milhões de pessoas na América Latina e coloca cerca de 100 milhões de pessoas sob potencial risco de infecção no mundo (Hotez, et al. 2012). A doença é considerada um importante problema de saúde pública na América Latina por ser endêmica em 21 países, entre eles, Argentina, Brasil, Colômbia e México (Dias et al., 2006; WHO, 2010). Estimativas recentes indicam que há 2-3 milhões de pessoas infectadas no Brasil. Embora tenha ocorrido redução no número de pessoas infectadas desde 1980, com a implantação de medidas de controle, a mortalidade atinge cerca de 6.000 indivíduos por ano. A doença também se propaga em movimentos migratórios para países não endêmicos como a América do Norte, Europa e algumas regiões do pacífico ocidental. Estima-se que há 300.000 indivíduos infectados nos Estados Unidos da América, acima de 80.000 na Europa, mais de 3.000 no Japão e acima de 1.500 na Austrália (WHO, 2010; Schmunis & Yadon, 2010).

O agente etiológico da doença de Chagas é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário pertencente à ordem Kinetoplastidae e à família Trypanosomatidae. Esse protozoário apresenta como estágios evolutivos no hospedeiro invertebrado as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica, e no hospedeiro vertebrado as formas amastigota intracelular e tripomastigotas circulantes no sangue. Estágios evolutivos intermediários também são descritos, como epimastigota intracelular e esferomastigota no hospedeiro invertebrado (Almeida-de-Faria et al., 1999; Souza, 1984).

A transmissão aos humanos ocorre através de insetos vetores hemípteros da família Reduviidae, que se infectam, durante o repasto sanguíneo, com a forma tripomastigota circulante no sangue de hospedeiro vertebrado (Figura 01). A maioria dos parasitos é eliminada no estômago do vetor, mas os sobreviventes se diferenciam em epimastigotas e se multiplicam por divisão binária no intestino do inseto. Após 3 a 4 semanas, epimastigotas se diferenciam na forma infectante tripomastigota metacíclica, que são eliminadas juntamente com as fezes do “barbeiro” no momento do repasto sanguíneo. Essas formas infectam hospedeiros vertebrados ao contatarem mucosas ou região de perda de continuidade da epiderme. No interior das células hospedeiras, tripomastigotas metacíclicos diferenciam-se em amastigotas e, após nove ciclos de divisões binárias no citosol, desenvolvem-se em

tripomastigotas que são liberadas após a ruptura da membrana celular alcançando a corrente sanguínea ou outros tipos celulares circunjacentes (Dvorak & Hyde, 1973).

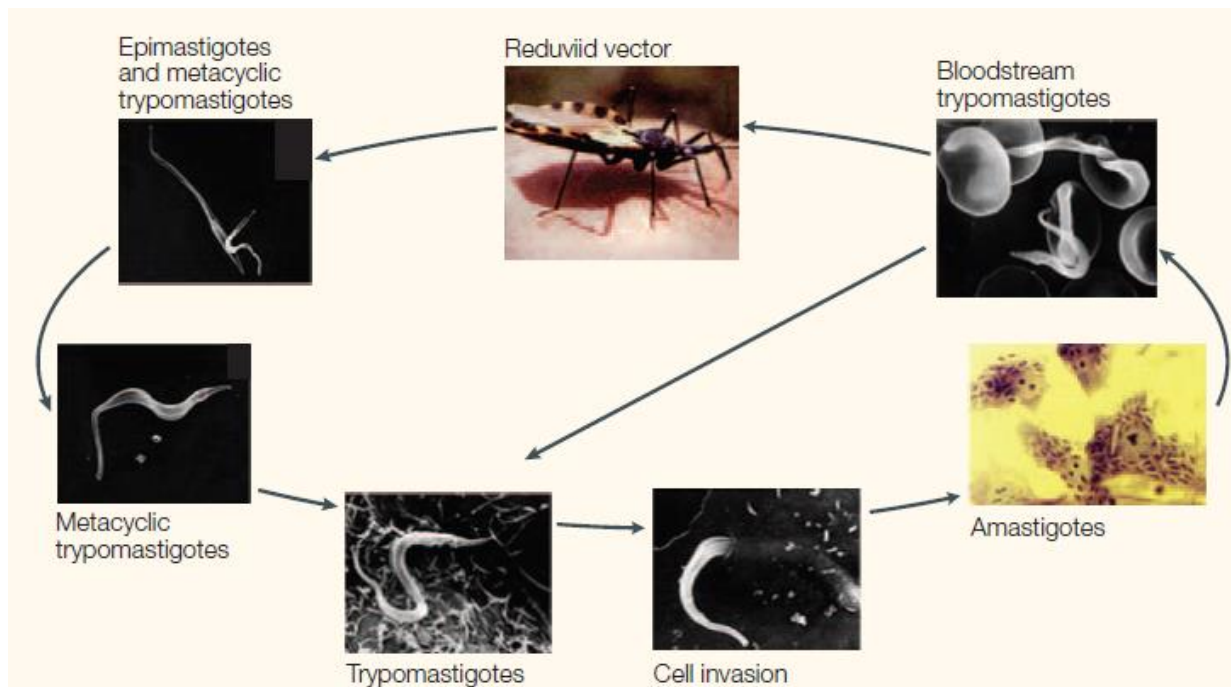


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (Retirado de Andrade & Andrews, 2005).

Em modelos experimentais, amastigotas liberadas para o meio extracelular após rompimento da célula parasitada podem ser encontradas na circulação sanguínea, admitindo-se a possibilidade de serem infectantes, embora em menor grau que as tripomastigotas metacíclicas (Mortara, 1991).

A incidência da doença de Chagas é maior em áreas rurais, onde há condições favoráveis à instalação do vetor (WHO, 2010). A transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans*, uma das principais espécies transmissoras, foi oficialmente eliminada do Brasil em 2006 mediante a execução de programas de controle do vetor. Contudo, nas últimas décadas, mudanças no perfil demográfico como a migração para a Amazônia brasileira têm sido parcialmente responsáveis pela alteração na transmissão vetorial, que inclui a transmissão pelos vetores exóticos *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Panstrongylus geniculatus* e *Panstrongylus lignarius* (Petherick, 2010).

A transfusão sanguínea é provavelmente a segunda forma de transmissão mais frequente do *T. cruzi*, e chega a ser responsável por mais de 20% dos casos relatados da doença em países em que a triagem de bancos de sangue é precária, como na Bolívia. A transmissão por transfusão sanguínea e a transmissão congênita são alvos de políticas de

saúde pública, inclusive em países não endêmicos, onde estas são as principais formas de transmissão da doença. Após a diminuição da transmissão vetorial, esse mecanismo tornou-se alvo da preocupação em relação ao controle da doença e alguns países, como o Brasil, implantaram a triagem sorológica obrigatória em bancos de sangue (Dias, 2006; revisado em Coura, 2015). A transmissão congênita está relacionada com os níveis da parasitemia materna, a qual é maior no último trimestre da gestação, aumentando-se o risco de transmissão durante este período. A produção de IFN- gamma pela gestante é um dificultador da transmissão, pois limita a multiplicação dos parasitos (Brutus et al., 2010). Atualmente a transmissão oral tem atraído atenção devido à ocorrência de surtos agudos da doença. Em 2006, 178 casos de doença aguda de Chagas foram reportados no norte do Brasil devido ao consumo de açaí (Nóbrega, 2009).

A doença de Chagas apresenta-se em duas fases clínicas, aguda e crônica, sendo que a fase crônica ainda é subdividida em forma indeterminada, forma cardíaca e forma digestiva.

A fase aguda da doença caracteriza-se pela presença de tripomastigotas na circulação sanguínea e pela proliferação de amastigotas nas células hospedeiras (Tanowitz et al., 1992). Nessa fase todas as células nucleadas do hospedeiro são alvos potenciais do parasito. Em geral, é uma fase assintomática ou com sinais clínicos inespecíficos como febre, hepatoesplenomegalia e reações inflamatórias de resolução espontânea em cerca de 90% dos indivíduos sem a necessidade de tratamento com drogas. O sinal de Romanã no sítio de entrada do parasita é um indicador importante da infecção natural (Dias, 1984). Em pacientes imunossuprimidos e crianças pode ocorrer invasão do sistema nervoso central pelo *T. cruzi*, desencadeando a meningoencefalite chagásica (Lazo et al., 1998; Lages-Silva et al., 2002). A mortalidade na fase aguda pode ser menor do que 5%, mas também pode chegar a 10%, especialmente em crianças que desenvolvem miocardite e/ou meningoencefalite (Teixeira et al., 1978; Brener, 1987; revisado em Rassi et al., 2010).

Cerca de 60% dos indivíduos com doença de Chagas apresentam a forma crônica indeterminada da doença, na qual o paciente apresenta sorologia positiva, mas não há sinais clínicos de acometimento cardíaco ou de órgãos do sistema digestivo (Brener, 1987). Estudos realizados no hospital universitário de Botucatu mostraram que este valor pode ser ainda maior, onde cerca de 70% dos pacientes com diagnóstico sorológico positivo para doença de Chagas apresentavam a forma indeterminada da doença (Geraix et al., 2007). Nesta fase, um ambiente imunomodulatório é estabelecido devido a uma menor expressão de HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related), com um aumento da produção de citocinas

por monócitos, como a IL-10 e por subconjuntos de células T, como a IL-17 (Souza et al., 2004).

Por ano, 2 a 5 % dos pacientes indeterminados desenvolvem a forma cardíaca da doença (Ianii et al., 2001). A cardiopatia chagásica tem impacto importante na saúde pública por sua alta morbidade. Cerca de 10% a 30 % dos pacientes na fase crônica desenvolvem a forma cardíaca da doença. Nesta fase o coração sofre danos, entre outros fatores, devido ao processo inflamatório, estabelecido pela alta expressão de TNF-alfa por monócitos, e devido ao processo de fibrose que substitui cardiomiócitos rompidos. Em cardiopatias mais graves pode ocorrer dilatação do órgão (Zhang & Tarleton, 1999; Souza et al., 2004). Descreve-se aumento dos níveis plasmáticos de TNF-alfa, INF-gamma, IL-1beta e IL-6 na cardiopatia chagásica (Sousa, 2014).

De 8% a 10% dos pacientes desenvolvem a forma digestiva, podendo ocorrer hipertrofia do esôfago e do intestino (Brener, 1987). Esses dados podem variar de acordo com a distribuição geográfica, sendo a forma digestiva encontrada particularmente na porção sul da bacia amazônica (Campbell et al., 2004).

Merece destaque a expansão da incidência da Doença de Chagas para além dos países da América Latina, como Estados Unidos da América, Canadá e Austrália. Estima-se que os custos do tratamento de pacientes chagásicos excedam os custos com doenças globais como a infecção por rotavírus, cólera e câncer cervical (Lee et al., 2013). Essa consideração, aliada ao impacto da doença sobre a saúde pública de modo geral, reforça a necessidade de não se negligenciar os esforços para eliminação dos vetores e o controle de todas as formas de transmissão.

1.2 Interação do Trypanosoma cruzi com a célula hospedeira

O *T. cruzi* tem a capacidade de infectar todos os tipos celulares nucleados derivados dos três folhetos embrionários de mamíferos. Tripomastigotas podem ser interiorizados por fagócitos profissionais (macrófagos e células dendríticas), assim como podem parasitar outros tipos celulares como células epiteliais, células endoteliais, fibras musculares cardíacas, esqueléticas e lisas, fibroblastos e células da glia (Tanowitz et al., 1992; Araújo-Jorge et al., 1992; Andrade, 2000). No sistema nervoso central, o *T. cruzi* infecta principalmente astrócitos, enquanto no sistema nervoso periférico as células gliais entéricas e as células de Schwann são os principais alvo da infecção (Mata et al., 2000; Tafuri et al., 1970).

As glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* são importantes para o processo de interiorização do parasito na célula hospedeira. As GPI-mucinas são glicoproteínas fortemente O-glicosiladas a cadeias de glicano que contêm resíduos aceptores de unidades de ácido siálico, como N-acetilglicosamina e β -galactose, sendo que estas unidades são transferidas por reações de trans-silalidase (Schenkman & Eichinger, 1993). Modificações nas glicoproteínas de superfície do *T. cruzi* alteram o padrão de infecção do parasito. A tunicamicina, antibiótico que bloqueia a N-glicosilação de polipeptídeos nos resíduos asparagina, diminui em até 80% a capacidade de infecção do parasito em LLC-MK2 (Zingales et al., 1985).

Recentemente, foi demonstrado que distintas populações de *T. cruzi* são capazes de transferir âncoras de GPI a superfície da célula hospedeira pelo mecanismo de trogocitose, mecanismo amplamente descrito em células do sistema imune. A troca de moléculas entre o parasito e a célula hospedeira é dependente de contato e pode direta ou indiretamente alterar seus fenótipos e provavelmente proporcionar vantagens de sobrevivência ao parasito (Mukherjee et al., 2015).

Um aspecto importante da interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira é a sua diversidade genética. Atualmente, seis DTUs (Discrete Typing Units) - TC I a TC VI - são associadas a esse parasito (Zingales et al., 2009). Vários trabalhos têm mostrado que diferentes populações de *T. cruzi* podem apresentar expressão diferencial de glicoproteínas na superfície de tripomastigotas metacíclicas. A cepa G, por exemplo, expressa abundantemente as glicoproteínas gp90 e gp35/50. Ao contrário, a cepa CL Brener não expressa a gp90 e expressam baixos níveis da gp35/50 (Ruiz et al., 1998). A expressão de gp82 é comparável em ambas populações. Esses autores observaram que a gp82 está diretamente associada à intensidade de mobilização de cálcio em células HeLa. Uma vez que a mobilização de cálcio por tripomastigotas da cepa CL é maior que a induzida pela cepa G, os autores propõem que, de algum modo, a expressão acentuada de gp90 e de gp35/50 pode impedir a ligação/adesão de tripomastigotas metacíclicos mediada por gp82 e consequente ativação da cascata de sinalização de Ca^{2+} necessária ao processo de invasão.

A forma de inoculação do parasito também parece ser um fator importante para o desenvolvimento da infecção. Covarrubias et al. (2007) mostraram que a infecção de camundongos por via oral com formas metacíclicas de SC, população de *T. cruzi* isolada de paciente com sintomas clínicos agudos severos, resulta em alta infectividade e induz taxa elevada de mortalidade. Por outro lado, o mesmo isolado exibe infectividade reduzida em células Hela e Caco-2, *in vitro*. No entanto, quando isolada da cavidade gástrica após

inoculação oral, essa população apresenta baixa expressão de gp90, que parece ser degradada pelo suco gástrico. Nessa condição, mudam o padrão de infecção de células de HeLa e Caco-2, com alta taxa de invasão.

Em macrófagos, a gp90 impede a remoção dos resíduos de açúcar do parasito necessários para a internalização do *T. cruzi* via sinalização Ca^{2+} -dependente (Nogueira, 1983). Esses dados indicam que a interação do *T. cruzi* com a célula-alvo é um fenômeno complexo que pode recrutar proteínas distintas em diferentes populações desse parasito, tornando mais intrigante o entendimento da infecção em humanos e em modelos experimentais.

T. cruzi também apresenta em sua superfície glicoproteínas da família transialidase, sialidasas modificadas capazes de transferir sialoglicoconjugados da célula hospedeira para glicoconjugados do parasito, incapaz de sintetizar essas moléculas (Previato et al., 1985). Pereira e colaboradores demonstraram, *in vitro*, com o clone Silvio X-1014 e, *in vivo*, com o clone Tulahuen C2, que a infecção de células não fagocíticas é ineficiente por diferentes populações de *T. cruzi* quando as transialidades são suprimidas (Pereira et al., 1996).

Outra molécula abundante na superfície de tripomastigotas é a TC85, uma glicoproteína pertencente a superfamília das transialidasas. A TC85 é uma glicoproteína multiadesiva que apresenta pelo menos dois sítios de ligação, um para laminina e outro para citoqueratina 18, permitindo que o parasita ultrapasse as barreiras impostas pela matriz extracelular e pela membrana da célula hospedeira. Magdesian et al. (2001) sugerem que a CK18 possa ser expressa na superfície celular, e não apenas no citosol, podendo, portanto, ligar-se ao domínio 11 da glicoproteína TC85 e comportar-se como um receptor em LLC-MK2, permitindo a interação do *Trypanosoma cruzi*.

A infecção da célula hospedeira é um processo multifatorial e depende, além das moléculas da superfície do hospedeiro, das moléculas da superfície da célula-alvo. Essas moléculas podem variar de acordo com o tipo celular. A infecção é inibida em fibroblastos quando são tratados com lectinas, como a concavalina A, tripsina e/ou com drogas que afetam a estrutura de microtúbulos, como colchicina e citocalasina B, pois alteram a composição das glicoproteínas e a arquitetura da membrana plasmática (Henriquez et al., 1981).

O mMGL, receptor de lectina do tipo C, é expresso exclusivamente em células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas e os macrófagos, e pode apresentar um importante papel na infecção. Foi demonstrado que em camundongos C57BL16 mMGL -/- há alta parasitemia e alta mortalidade quando estes são infectados via peritônio pela cepa

Querretaro. Além do mais, esse receptor pode ser importante na resposta imune devido a ativação otimizada de macrófagos e pela produção de citocinas nas fases iniciais de infecção ocasionada pelo sinergismo deste receptor com o receptor TLR-4 (Vázquez et al., 2014).

Já o receptor MR, receptor de manose, presente na superfície de macrófagos, interage com o antígeno cruzipain, glicoproteína com manose em seu domínio C-terminal. Macrófagos J774 incubados com anticorpo antiMR apresentam redução na atividade de arginase - enzima que compete com a iNOS pela L-arginina - e na proliferação dos parasitos da cepa Tulahuen (Garrido, 2011).

Outro receptor abundantemente expresso nas fases aguda e crônica da doença de Chagas é o CCR5, receptor de quimiocinas CC. Camundongos CCR5 *-/-* infectados pela cepa Colombina apresentam altos níveis de parasitemia sugerindo que este receptor contribui para o controle da replicação do parasito (Hardison, 2006).

O receptor TrKC, receptor tirosina quinase, parece ter papel importante na mediação da invasão pelo clone Silvio x-10/4 *in vivo* e *in vitro*. Em células neuronais PC12-NNR5 ocorre um aumento de 85% da invasão pelo parasito quando estas células são transfectadas com TrKC. Por sua vez, bloqueadores de TrKC inibem a infecção de cultura primária de astrócitos. As células epiteliais CHO Lec1 tornam-se mais permissíveis a invasão pelo parasito após transfecção com o gene humano *trkC* (Weinkauff et al., 2011). Esses dados demonstram que assim como as glicoproteínas anteriormente citadas, os receptores da célula-alvo também são fundamentais no processo de invasão celular.

Embora um progresso significativo tenha sido alcançado na identificação de moléculas de superfície do parasita envolvidas no processo de interação com a célula-alvo (Figura 2), informações complexas estão disponíveis sobre a natureza dos ligantes da célula hospedeira envolvidas em tais processos. Esta é certamente uma área importante para pesquisas futuras (Barrias et al., 2013).

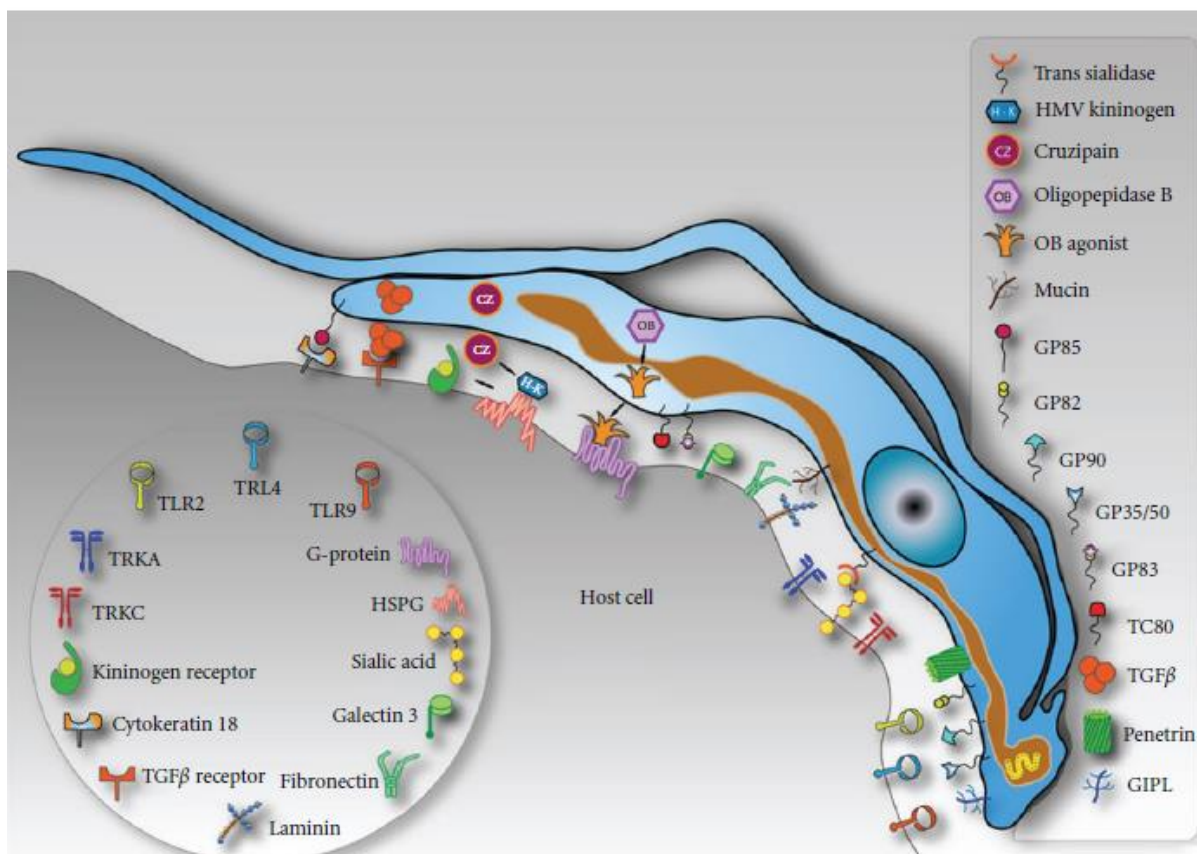


Figura 2. Síntese esquemática de moléculas envolvidas na interação de *T. cruzi* com a célula hospedeira. Retirado de Barrias, et al 2013.

Na maioria dos fagócitos não-profissionais, a invasão de *T. cruzi* ocorre por um mecanismo independente da polimerização de actina e não requer a formação de pseudópodes característicos da fagocitose (Tardieux et al., 1992). Essa interiorização, embora seja independente de actina e de filamentos intermediários, necessita da ação de microtúbulos, os quais são responsáveis pelo transporte de lisossomos até o local da adesão inicial dos parasitos (Matteoni & Kreis, 1987).

O recrutamento de lisossomos para o sítio de adesão do *T. cruzi* é sinalizado pelo aumento de Ca^{2+} citosólico. O trifosfato de inositol gerado pela hidrólise de fosfatidilinositol induz a liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} (Rodriguez et al., 1995). Além dos eventos de sinalização que mobilizam Ca^{2+} dos estoques intracelulares, o influxo de Ca^{2+} através da membrana celular lesada também contribui para o processo de entrada do parasito na célula. Essa lesão da membrana pode ser promovida de forma mecânica durante a interação do parasito com a célula hospedeira ou através da proteína formadora de poro secretada pelo *T. cruzi* que tem como função a liberação do parasito do vacúolo parasitóforo, mas que em pH neutro ainda possui uma função residual suficiente para a formação de poro na membrana celular.

Os lisossomos recrutados liberam esfingomielinase ácida responsável pela produção de microdomínios ceramida e pela invaginação da membrana plasmática. O parasito é interiorizado em um vacúolo parasitóforo rico em ceramida, o qual é posteriormente reforçado pela deposição de membranas lisossômicas. Este processo é essencial para a manutenção do ciclo intracelular dos parasitos, pois impede a alta motilidade dos parasitos, retendo-os no interior celular (Figura 3) (Andrade & Andrews, 2004; Fernandes et al., 2011; revisado em Fernandes & Andrews, 2012).

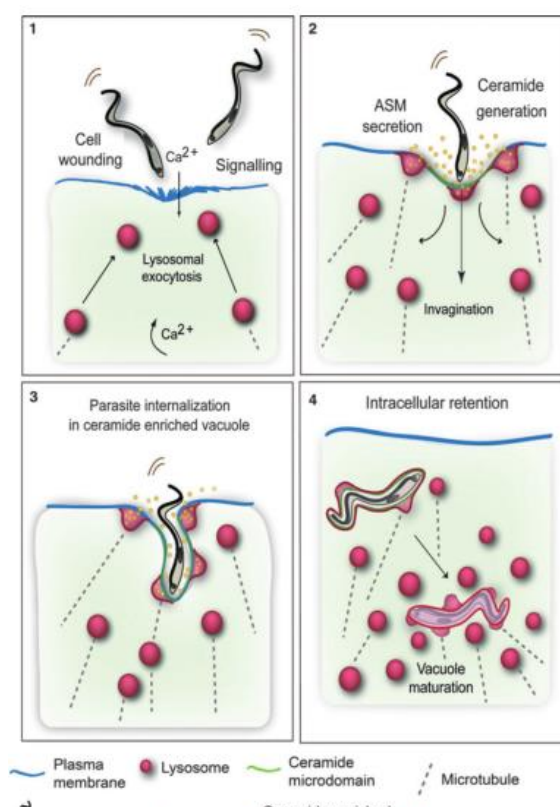


Figura 4. Modelo de invasão de *T. cruzi* mediado por lesão e reparo da membrana celular ou por eventos de sinalização. (Retirado de Fernandes & Andrews, 2012).

Jangadas de membrana são descritas como participantes da invasão de *T. cruzi* em células fagocíticas e em células fagocíticas não-profissionais (Barrias et al, 2007; Fernandes et al., 2007). Em cardiomiócitos a infecção pelo *T. cruzi* é reduzida com o tratamento com a droga methyl- β -cyclodextrin (M β CD). Esta droga é responsável pela depleção de colesterol que é o principal componente das jangadas lipídicas. Com a desestabilização das jangadas lipídicas, ocorre exocitose excessiva de lisossomos nos estágios iniciais de tratamento o que compromete a invasão do parasito devido a depleção de lisossomos no córtex celular. (Hissa et al., 2012). O mesmo não é observado quando estas células são tratadas com Lacolamina-A, um despolicimerizante de actina que recruta um pool de lisossomos mais interno. Estes dados

indicaram a possibilidade de haver dois pools de lisossomos, sendo que apenas os lisossomos do córtex celular estariam envolvidos no processo de invasão celular e provavelmente os lisossomos presentes próximo ao núcleo estariam envolvidos com processos de digestão celular (Hissa et al., 2014). Em macrófagos submetidos ao tratamento com M β CD a redução da internalização do parasito chega a 80%. Além disso, marcadores de jangadas lipídicas, como caveolina 1 e o gangliosídeo GM1, foram encontrados nos vacúolos parasitóforos, o que sugere a participação de jangadas de membrana no processo de internalização (Barrias et al., 2007).

Recentemente, uma nova família de proteínas da superfície de *T. cruzi* foi descrita como participante da invasão de células hospedeiras de mamíferos. A TcSMP (Trypanosoma cruzi Surface Membrane Proteins) induz a via de sinalização de Ca²⁺ e recruta lisossomos para periferia da célula hospedeira. A incubação de formas metacíclicas da cepa CL-Brener com TnSMP recombinante resulta na inibição da invasão de células HeLa por essa população de *T. cruzi*. Por sua vez, o mesmo procedimento com gp82 recombinante requer a utilização de metade da concentração dessa proteína para inibir a invasão de mesmo tipo celular. A utilização simultânea das duas proteínas recombinantes não apresenta efeito aditivo sobre a invasão (Martins et al., 2015).

Outra via foi proposta para a internalização baseada na alta motilidade dos parasitos e que independeria inicialmente dos lisossomos. Nesta via a invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira ocorreria pela despolimerização dos filamentos de actina. O vacúolo formado pela invaginação da membrana seria rico em lipídeos formados pela PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinase) e não possuiria marcadores lisossomais, como a LAMP-1. Com o passar do tempo de infecção estes marcadores seriam expressos, sugerindo que a fusão com os lisossomos poderia ocorrer após a internalização do parasito (Woolsey et al., 2003). Porém estudos subsequentes mostraram que a ausência de recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito tornava a infecção inviável, pois o vacúolo parasitóforo nascente seria reversível. Desse modo provavelmente não é possível ocorrer a invasão do parasito apenas pela invaginação da membrana celular e foi sustentada a importância da presença do lisossomo do sítio de entrada do parasito na célula-alvo (Andrade & Andrews, 2004).

Com o processo de parasitismo celular, é iniciada a resposta imune no organismo do hospedeiro que também está diretamente relacionada ao reconhecimento de moléculas de superfície do *T. cruzi* pelos receptores do tipo Tool-like (TLRs) das células-alvo. O TLR2 é responsável pelo reconhecimento das âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI), maior família

de macromolécula de superfície em tripomastigotas, induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos (Ozinsky et al., 2000; Campos et al., 2001). Nesse tipo celular, a ligação com TLR2 ativa cascata de transdução de sinal que promove a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e conseqüentemente resposta celular pró-inflamatória (Ropert et al., 2001). A ativação de NF- κ B promove transcrição de citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral), IL-1 β (Interleucina1 β), IL-6 (Interleucina 6) e da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), responsável pela produção de óxido nítrico (Campos et al., 2001).

Estudo com camundongos knock out para o receptor TLR2 mostrou que a presença deste receptor é responsável por cerca de 40% da produção de TNF-alfa em células do baço. Nesse estudo foi mostrado também que a produção de TNF-alfa independe do receptor TLR9 e dos níveis de IFN-gamma, confirmando que a ligação do receptor TLR à moléculas da superfície do parasito leva a produção de citocinas de acordo com o tipo de receptor ao qual está ligada (Gravina et al, 2013)

Células fagocíticas não profissionais também são capazes de secretar moléculas inflamatórias em resposta a infecção por *T. cruzi*, como TNF, IL-1 β , IL-6 e NO (Machado et al., 2000), além de poderem apresentar também ativação de fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 durante a infecção *in vitro* (Huang et al., 2003). A adesão e invasão de *T. cruzi* em células do hospedeiro é um processo complexo que envolve moléculas do parasita e do hospedeiro.

Outros receptores celulares também podem ser importantes na resistência contra a infecção por *T. cruzi*, como o mMGL (Macrófago Galactose-type lectin), receptor presente em APC, DC e macrófagos que em sinergia com receptores TLR4 podem induzir vias para a produção de TNF-alfa, IL-1beta e NO nos períodos iniciais de infecção (Vázquez et al., 2015). WBC e PBMC também aumentam a secreção de TNF-alfa após estimulação por amastigotas (Rezende-Oliveira et al., 2012). Por outro lado, células epiteliais intestinais, Caco-2 e HT-29, e células epiteliais pancreáticas, Panc-1, apresentam alteração no padrão de secreção de citocinas quando infectadas por *T. cruzi*, havendo uma diminuição na produção de TNF-alfa (Martello et al., 2013).

2 Justificativa

Em modelos experimentais, a inoculação com diferentes populações de *T. cruzi* pode resultar em infecção com características anatomopatológicas distintas, como taxa de parasitismo e grau de inflamação, assim como índices de mortalidade variáveis na fase aguda da infecção (Camargos et al., 2000; Andrade, 1990).

Em camundongos BALB/c, a infecção com o clone CL Brener leva a uma alta parasitemia, aumento da liberação de mediadores pró-inflamatórios e alta mortalidade. Já a infecção com a cepa JG induz uma baixa parasitemia sem alteração nos níveis cardíacos de TNF-alfa. A inoculação de ambas populações gera um perfil de parasitemia intermediária, porém com mortalidade acentuada (Rodrigues et al., 2010).

O clone CL Brener causa alta mortalidade em ratos jovens. No entanto, a inoculação dupla da cepa JG e clone CL Brener resulta em infecção com mortalidade reduzida ou praticamente nula (Franco et al., 2003). Ratos jovens infectados pelo clone CL Brener apresentam uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e expansão de células $CD3^+CD4^-CD8^-$, quando comparados a infecção com a cepa JG, o que pode explicar a maior infectividade da cepa CL Brener e a maior agilidade na resolução da infecção aguda (Nagib et al., 2007).

A ativação de células inflamatórias também depende da população de *T. cruzi*. O clone Col1.7G2 pertencente a DTU/TCI promove uma maior ativação de monócitos e, conseqüentemente, uma maior produção de IL-10, quando comparada com a cepa Y da DTU/TCII (Magalhães et al., 2015).

Estudos realizados *in vitro* também apontam para diferenças importantes na interação de diferentes populações de *T. cruzi* com a célula hospedeira. A invasão *in vitro* de células Vero e células HeLa pelas formas metacíclicas de populações TCII (cepa Y) é significativamente maior do que a invasão pelas populações TCI (G e Tulahuen). Porém, na infecção ocasionada por amastigotas extracelulares, as populações TCI exibem maior taxa de invasão quando comparadas a populações da TCII, mostrando que também existe diferenças na infecção com as formas evolutivas do parasito. Ainda, a invasão por amastigotas extracelulares da cepa G apresenta alterações no padrão de invasão em células epiteliais MDCK com alterações na expressão de GTPases quando comparada a cepa Tulahuen,

mostrando que as diferenças também ocorrem entre populações pertencentes ao mesmo TC (Fernandes & Mortara, 2004).

Nosso grupo de pesquisa mostrou *in vitro* um aumento de parasitos intracelulares da cepa Y em células LLC-MK2 e HEK 293T quando estas são submetidas ao tratamento com TNF-alfa por 6 horas, previamente à infecção. Esse resultado foi observado nos momentos iniciais - 2 horas após infecção - e também 22 horas após a infecção. As células LLCMK2 apresentavam o dobro de parasitos intracelulares quando comparadas as células HEK293T, e o aumento de parasitos intracelulares foi claramente dependente da concentração de TNF. Fatores solúveis secretados por monócitos também estimulavam o aumento da invasão do parasito nessas células epiteliais, reforçando a ação de citocinas sobre o processo (Pinto et al., 2005).

O nosso grupo de pesquisa também demonstrou que culturas primárias de astrócitos e de micróglia apresentam uma maior quantidade de amastigotas intracelulares da cepa Y quando essas células são incubadas com TNF-alfa antes da infecção. Contudo, o mesmo resultado não foi observado com o clone Col1.7G2 (França, 2015). Já em cultura primária de cardiomiócitos submetidas a tratamento com TNF-alfa prévio à infecção com a cepa Y ocorre uma diminuição na proporção de células infectadas e no número de parasitos intracelulares (Mattos, dados não publicados).

Os resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa indicam ser relevante avaliar o efeito de tratamento prévio com TNF sobre a infecção de células epiteliais LLC-MK2 e HEK 293 pelos clones Col1.7G2 e CL Brener, pertencentes, respectivamente, a TCI e TCVI.

3 Objetivos

O principal objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos do tratamento com Fator de Necrose Tumoral - TNF-alfa - sobre a infecção *in vitro* de células epiteliais com populações distintas de *T. cruzi*.

São objetivos específicos desse trabalho, avaliar, nas células LLC-MK2 e HEK293 infectadas com o clone Col1.7G2 ou com o clone CL-Brener, os efeitos do tratamento prévio com TNF sobre:

- i) A proporção de células infectadas;
- ii) O número de amastigotas intracelulares;
- iii) A ultraestrutura de células epiteliais.

4 Material e Métodos

4.1 - Obtenção, manutenção e plaqueamento de LLC-MK2 e HEK-293

Nesse estudo utilizaram-se células LLC-MK2 (monkey kidney epithelial cell line) e HEK293 (human embryonic kidney cell line) mantidas em incubadora umidificada a 37°C com de 5% de CO₂ no Laboratório Profa. Conceição Machado. As células HEK-293 foram recentemente cedidas pelo Prof. Aristóbolo Mendes da Silva, do Departamento de Morfologia, ICB/UFMG. A cada 7 dias, procedia-se ao repique das células LLC-MK2, cultivadas em garrafas T75 cm². Por sua vez, as células HEK293 foram cultivadas em garrafa T25 cm² e submetidas a repique a cada 3 dias. Ambas as linhagens foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - Invitrogen) suplementado com 10% de FBS (Soro Fetal Bovino - Invitrogen) e com 1% de Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen).

Para o repique dessas células nos períodos acima especificados, quando as culturas atingiam 80% de confluência celular, o meio de cultivo foi substituído por solução salina tampão-fosfato (PBS) para lavagem das células e, logo a seguir, por 1 mL de solução de tripsina a 0,05% para que as células aderidas à superfície da garrafa fossem soltas (Invitrogen). Após 1 minuto na estufa, foram adicionados 9mL e 6mL de meio DMEM 10%, respectivamente, às LLC-MK2 e HEK293. A seguir, coletavam-se 10µL da suspensão celular para diluição em solução de Azul de Tripán (Sigma-Aldrich) para contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Após a contagem de células viáveis, nova alíquota de suspensão de células foi diluída em meio DMEM 10% para obtenção de 3x10⁵ células/mL. O volume de 500µL dessa suspensão foi transferido para cada um dos poços de uma placa de 24 poços contendo lamínula de vidro circular tratada com solução de Poli-L-Lisina (Sigma, 1:10 em água destilada). A placa foi mantida em incubadora umidificada a 37°C sob 5% de CO₂ por 24 horas para adesão e obtenção de 80% de confluência celular.

4.2 Obtenção e manutenção dos clones Col1.7G2 e CL-Brener de *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotas dos clones Col1.7G2 e CL Brener foram gentilmente cedidos pelo Prof. Egler Chiari, do Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG. Os tripomastigotas foram obtidos do sangue do

plexo orbital de camundongos infectados, procedimento realizado pelo Sr. Carlos Afonso, técnico do laboratório acima referido.

As formas tripomastigotas foram mantidas, por repiques sucessivos a cada 7 dias, em LLC-MK2 cultivadas em meio DMEM suplementado com 2% FBS e 1% penicilina-estreptomicina, em incubadora a 37°C sob 5% de CO₂. No sétimo dia após a infecção, período em que ocorria rompimento da maioria das células e liberação dos tripomastigotas, o meio foi coletado, transferido para tubos tipo Falcon e centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. A seguir, os tubos foram mantidos em incubadora por 2 horas para separação das formas amastigotas que foram retidas no pellet. O número de parasitos/mL foi obtido mediante contagem em câmara de Neubauer. Tripomastigotas assim obtidos foram congelados à -80°C na concentração de 5×10^7 parasitos por criotubo em solução de 10% dimetilsulfoxido (DMSO) diluída na proporção de 1:10 em FBS. Após cinco repiques sucessivos, as células LLC-MK2 foram desprezadas.

4.3 Análise da atividade de luciferase

Os ensaios foram realizados para verificar a funcionalidade das alíquotas de TNF-alfa que foram utilizadas nos experimentos. Os testes foram realizados em células HEK293 plaqueadas em placa de 24wells na quantidade de 100.000 células por poço. Após 24 horas de plaqueamento, as células foram transfectadas com os plasmídeos repórter e após 24 horas da transfecção as células foram estimuladas com TNF por 8h. Para os testes foi utilizado o Kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) a partir dos extratos celulares totais obtidos dos experimentos de transfecção. Após descongelamento, as amostras foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL (Axygen Scientific). Após centrifugação a 8.000 x g por 5 minutos, 5µL do extrato celular de cada amostra foi transferido por poço de uma placa de 96 wells opaca, de cor branca (FluoroNunc, Nunc, EUA). Em cada poço foram adicionados 40µL do reagente LARII (Promega), seguido da leitura das amostras em luminômetro (LumiCount™, Packard Instruments). Logo após a leitura da luciferase de vagalume a placa foi retirada do aparelho e então foram adicionados 40µL do reagente Stop & Glo (Promega) a cada poço para a leitura da luciferase de Renilla. Os valores obtidos das leituras são registrados e salvos automaticamente pelo programa Reader (Packard Instruments, USA). A atividade relativa da luciferase foi determinada pela razão do valor da

leitura da luciferase de vagalume (pGL3-E-Sel) sobre o valor da leitura da luciferase da Renila (pRL-TK).

4.4 Tratamento de LLC-MK2 e HEK293 com TNF-alfa

Solução estoque de TNF-alfa (Sigma-Aldrich, 10 µg) foi preparada mediante dissolução em 1mL de DMEM com 2% de FBS. Alíquotas estoque contendo 20µL dessa solução de TNF-alfa (10 µg/mL) foram mantidas congeladas em freezer -20° C para utilização nos experimentos.

Após 24 horas de plaqueamento, as células foram tratadas com 5, 10, 20 ou 50 ng/mL de TNF-alfa. Para o preparo da solução de 5ng/mL, 2 µL da solução estoque de TNF-alfa foram diluídos em 4mL de meio DMEM com 2% de FBS. Para obtenção das demais concentrações, 4, 8 e 20 µL das alíquotas de TNF-alfa foram diluídos, respectivamente, em 4mL de meio. Após 6 horas de incubação com TNF-alfa, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e infectadas com o clone CL-Brener ou com o clone Col1.7G2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos por mais duas vezes com células e parasitos provenientes de outra alíquota descongelada.

Também foi realizado como controle, nos tempos de 2 e 24 horas, a infecção de células HEK293 pela cepa Y, com e sem tratamento com TNF-alfa.

Teste de viabilidade celular não foi realizado em nosso trabalho, porque dados obtidos anteriormente com os mesmos tipos celulares mostraram que o tratamento com TNF-alfa não interfere com a viabilidade dessas células (Pinto et., 2011)

4.5 Infecção de LLC-MK2 e HEK93 com os clones Col1.7G2 e CL-Brener de Trypanosoma cruzi

LLC-MK2 e HEK293 infectadas pelo clone Col1.7G2 ou pelo clone CL Brener, na proporção de 10 parasitos/célula, durante 2 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS para retirada dos parasitos extracelulares. Nova solução de meio DMEM com 2% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina foi adicionada ao cultivo. Este momento

foi considerado o tempo zero de infecção. A seguir, as placas foram mantidas em incubadora por 2 horas ou por 22 horas.

4.6 Contagem de parasitos em microscopia de fluorescência

Após 2 ou 22 horas de infecção, o meio de cultivo foi substituído por solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M. As células foram fixadas por 30 minutos e, a seguir, as lamínulas foram coletadas e transferidas para uma lâmina histológica e lavadas com PBS por três vezes. A seguir, 100µL de solução DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride - Sigma) diluídos em PBS (1:500) foram depositados sobre as lamínulas por 5 minutos para coloração de DNA nuclear e de cinetoplasto.

No tempo de 2 horas após infecção, as células foram processadas para identificação imunocitoquímica de tripomastigotas extracelulares antes da coloração com DAPI. Para isso, foram lavadas com PBS, incubadas com PBS/BSA/Tween 20 (1% PBS/BSA e 0,1 % de Tween 20) por 01 hora para bloqueio de ligações inespecíficas e, após esse período, incubadas por 12 horas com anticorpo primário anti-*T.cruzi* obtido em coelho na concentração de 1:500 (diluído na solução de bloqueio PBS/BSA /Tween 20). Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho na concentração de 1:400 (diluído na solução de bloqueio de PBS/BSA /Tween 20 na concentração de 1:10) conjugado com Alexa flour 546 (Sigma) para marcação dos parasitos aderidos na superfície da célula. Antes da coloração com DAPI, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS.

As lamínulas foram analisadas em microscópio de fluorescência Axioplan 2 Zeiss com objetiva de 40x. Em ambos os experimentos – 2 e 22 horas de infecção - cerca de 600 células foram contadas e computada a proporção de células infectadas. A porcentagem de células infectadas foi obtida dividindo-se o número de células infectadas pelo número total de células. Nos mesmos campos foi computado o número de parasitos intracelulares. Esse número foi expresso em número de parasitos intracelulares por 100 células infectadas. Os parasitos corados com anti-*T. cruzi* foram considerados extracelulares e subtraídos do número de parasitos corados por DAP para obtenção do numero de amastigotas intracelulares.

4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para estudo em microscopia eletrônica de transmissão, utilizaram-se células LLC-MK2 tratadas ou não com TNF-alfa e infectadas ou não com os clones Col1.7G2 ou CL Brener, conforme descrito anteriormente.

As células LLC-MK2 foram plaqueadas, na mesma concentração descrita anteriormente, diretamente nas placas de 24 poços, ou seja, sem interposição de lamínula. Após 2 ou 22 horas de infecção, o meio foi substituído por solução de tripsina a 0,05% . Após 1 minuto, foram adicionados 500 µL de meio DMEM e a suspensão de células foi coletada e centrifugada a 2200 rpm para obtenção de *pellet*. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e substituído por PBS e centrifugado novamente. A solução de PBS foi substituída por solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2%) em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4. Após 12 horas, a solução fixadora foi substituída por solução de tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4. As amostras foram levadas ao Centro de Microscopia da UFMG para processamento de rotina para inclusão em resina Epon. Em síntese, os *pellets* foram fixados em solução de tetróxido de ósmio a 2% em água, lavadas e embebidas em agarose a 17,8%. Após imersão em solução de acetato de uranila a 2% em solução aquosa de 13,3% de sacarose por 12 horas, as amostras foram lavadas em água destilada, desidratadas em soluções com alcoólicas de concentração crescentes, imersas em acetona e incluídas em resina Epon. Secções ultrafinas obtidas em ultramicrótomo foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI - 120 kV. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tendo em vista que a utilização de tripsina para obtenção da suspensão celular poderia afetar a distribuição de organelas no citoplasma, novos experimentos foram feitos utilizando-se a técnica de “flat embedding”. Para isso, LLC-MK2 foram cultivadas por 24 horas em placa de 6 poços sobre lamínulas de Newbauer na concentração de $7,0 \times 10^5$ células por poço. A seguir procedeu-se ao tratamento por 6 horas com 20 ng/mL de TNF- α e infecção, por 2 horas, com $2,3 \times 10^6$ parasitos/mL do clone Col1.7G2 ou do clone CL Brener, como descrito anteriormente. A seguir, o meio foi substituído por solução fixadora de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2%) em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2-7,4. Após 12 horas, a solução fixadora foi substituída por solução de tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4. As lamínulas foram levadas ao Centro de Microscopia da UFMG para processamento

pela técnica de flat embedding”, ou seja, as células permaneceram aderidas na lamínula até a finalização da inclusão.

4.8 Viabilidade celular

Pinto et al. (2001), mostraram pelo ensaio MTT que LLC-MK2 e HEK293T continuam viáveis após tratamento prévio com TNF-alfa e infectadas com *T. cruzi*.

4.9 Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm DP para comparação entre os grupos. Nas análises para os experimentos na proporção 10 parasitos/célula, foi utilizado o teste Mann Whitney. Nas análises para testes não paramétricos referentes aos testes com diferentes concentrações de TNF-alfa, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis. Nas demais análises, para testes paramétricos, foi utilizado o teste One-way análise de variância e o pós-teste Bonferonni's para pares selecionados de colunas. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $P < 0,05$. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 5.

5 Resultados

5.1 Infecção de LLC-MK2 e HEK293 pelo clone Col1.7G2

LLC-MK2 e HEK293 foram infectadas com tripomastigotas do clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos por célula. O percentual de células infectadas e o número de parasitos intracelulares/100 células foram obtidos mediante contagem de células e de parasitos nos tempos de 2 horas e 22 horas após a infecção, utilizando-se microscopia de fluorescência.

A infecção de células LLC-MK2 com esse clone resultou em valores percentuais médios de 31,57% e 21,67% de células infectadas nos tempos de 2 e 22 horas, respectivamente (Figura 4A). Em relação ao número de parasitos/100 células, observaram-se os valores médios de 149,20 e 181,67 nos tempos de 2 e 22 horas de infecção (Figura 5B).

A Fig. 5 representa o padrão de infecção de células LLC-MK2 com o clone Col1.7G2, na proporção de 10 parasitos/célula. A Fig. 6 mostra tripomastigotas desse clone marcados por técnica imunocitoquímica para identificação de proteína de membrana.

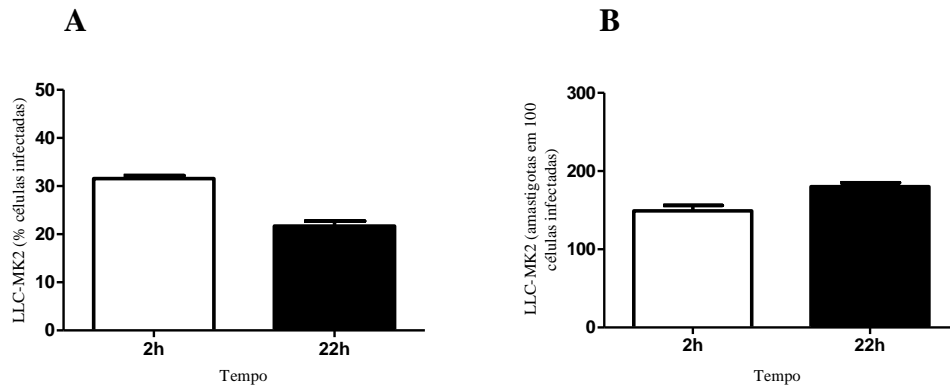


Figura 4. Porcentagem de LLC-MK2 infectadas (A) e número de amastigotas em 100 células infectadas (B) com o clone Col1.7G2 na proporções de 10 parasitos/célula, 2 e 22 horas após infecção. ($p \geq 0,05$; teste Mann Whitney).

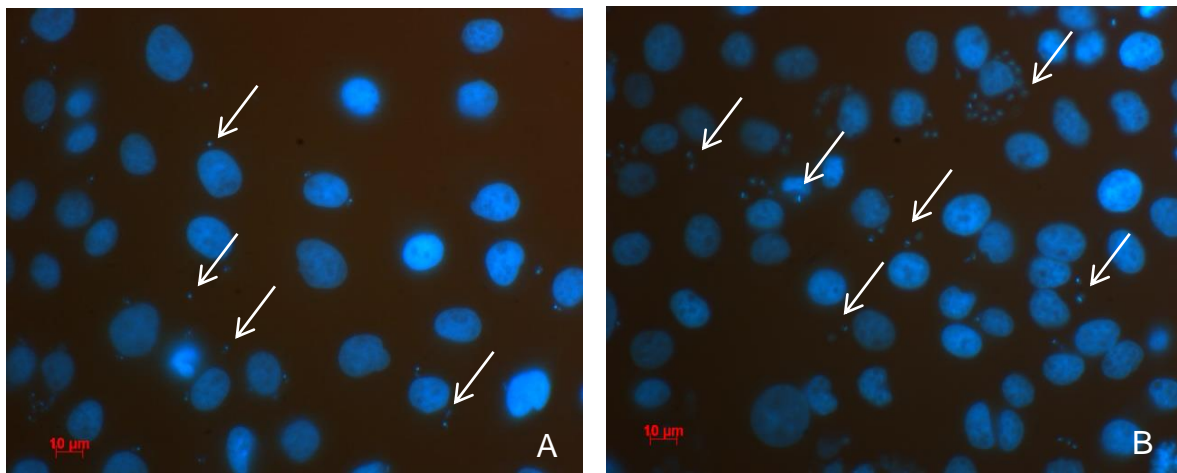


Figura 5. LLC-MK2 infectadas pelo clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/célula e analisadas 2 (A) e 22 (B) horas após a infecção. Coloração por DAPI. Setas indicam amastigotas. (Aumento original de 6300x).

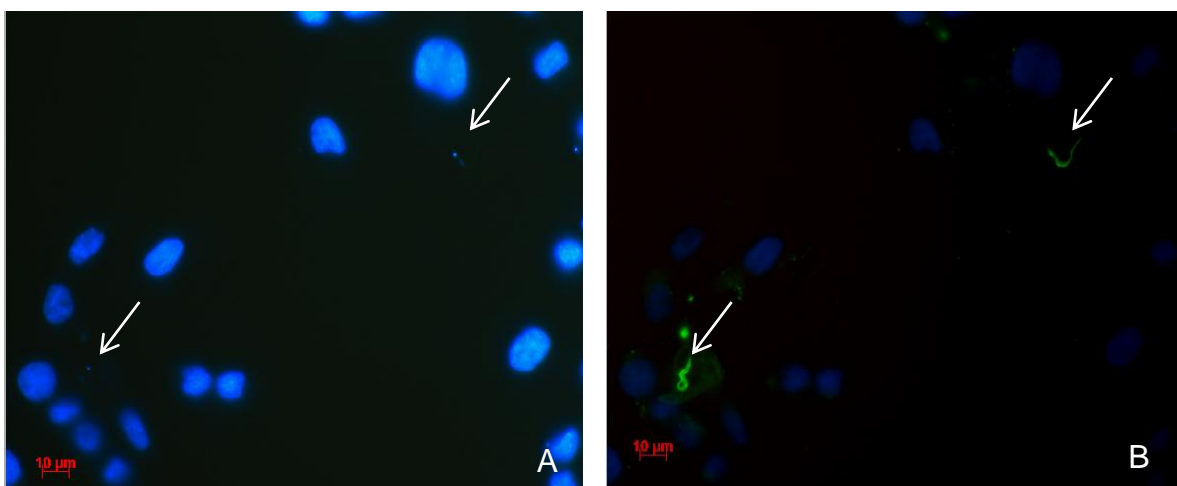


Figura 6. LLC-MK2 infectadas com clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/célula e analisadas 2 (A) e 22 (B) horas após a infecção. Coloração por DAPI. Setas indicam tripomastigotas. (Aumento original de 6300x).

Por sua vez, na infecção de células HEK293 com o clone Col1.7G2 observaram-se valores percentuais médios de 24,54% e 26,21% de células infectadas nos tempos de 2 e 22 horas, respectivamente (Figura 7A). Em média, foram observados 134,33 e 150,00 parasitos em 100 células infectadas, respectivamente, nos tempos de 2 e 22 horas de infecção (Figura 7B).

A Figura 9 representa o padrão de infecção de células HEK293 com o clone Col1.7G2.

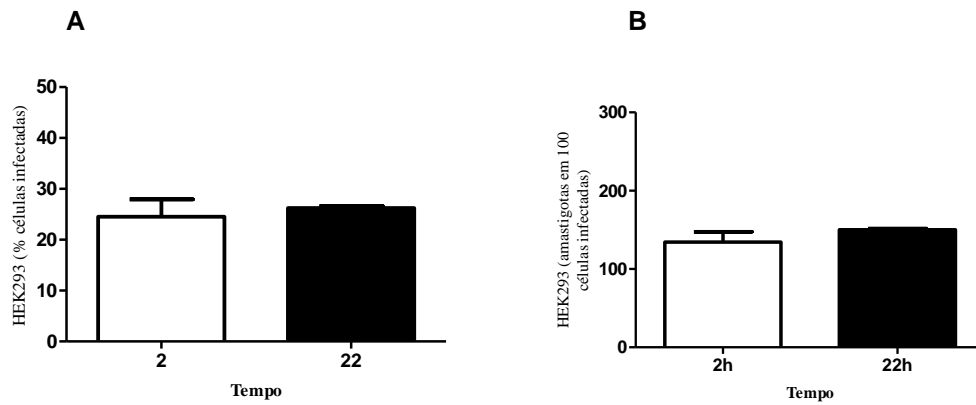


Figura 7. Porcentagem de células HEK293 infectadas (A) e número de amastigotas em 100 células (B). Infecção com o clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/ célula, 2 e 22 horas após infecção. ($p \geq 0,05$ teste Mann Whitney).

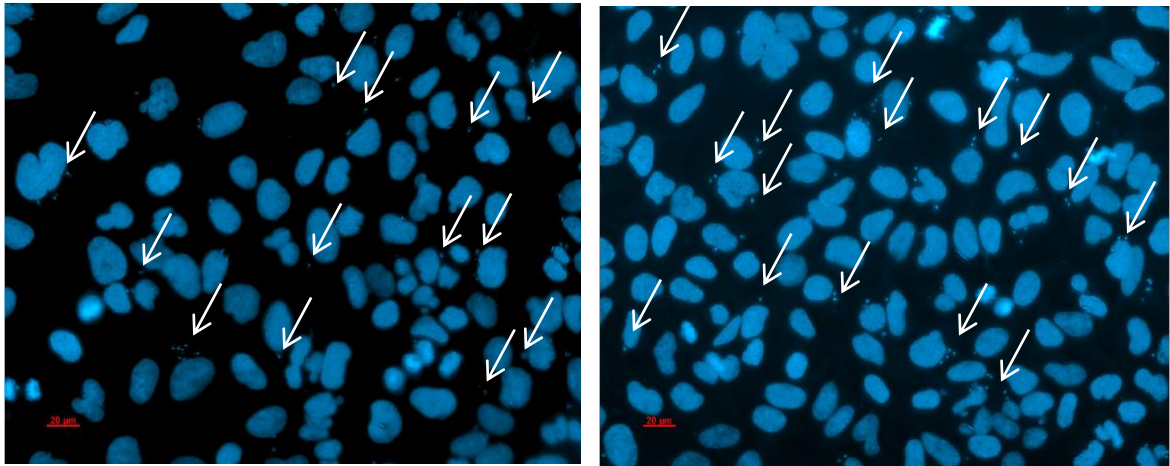


Figura 8. HEK293 infectadas com clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/célula e analisadas 2 (A) e 22 (B) horas após a infecção. Coloração por DAPI. Setas indicam amastigotas. (Aumento original de 4000x).

5.2 Análise da ação do TNF-alfa

Células HEK293 tratadas pelas alíquotas 1 e 2 de TNF-alfa utilizada ao longo dos experimentos e pelo TNF-alfa controle apresentaram atividade de Luciferase (E-Sel) significativamente maior quando comparadas à células não tratadas por TNF-alfa (Figura 9). A atividade das células não tratadas foi em média 3,76, enquanto a média de atividade do controle e alíquotas de TNF-alfa 1 e 2 foram 24,74; 22,05 e 19,50 respectivamente.

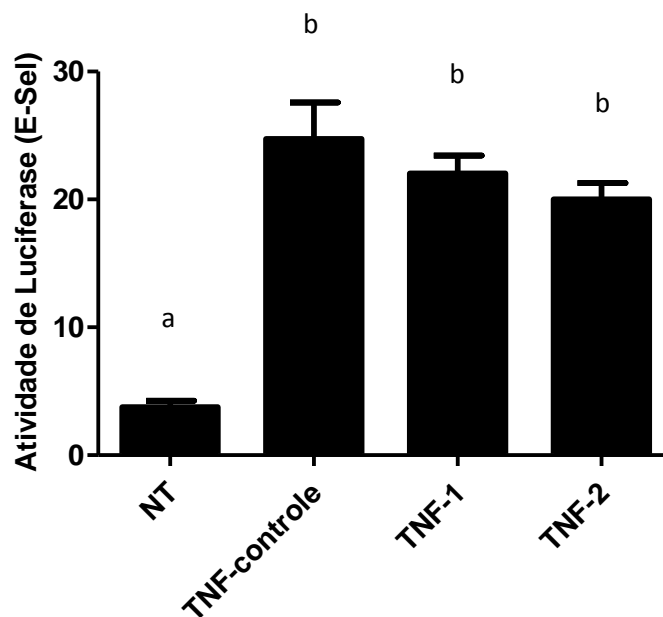


Figura 9. HEK 293 submetidas ao estímulo de TNF-alfa por 8 horas. NT (células não tratadas), TNF-alfa controle (TNF-alfa sabiamente funcional), TNF-1 e TNF-2 (alíquotas de TNF-alfa utilizadas nos experimentos). $p \geq 0,05$. One way ANOVA.

5.3 Efeito do pré-tratamento com TNF-alfa sobre a infecção de LLC-MK2 e HEK-293 pelo clone Col1.7G2 e efeito da infecção pela cepa Y em células HEK 293

A Figura 10 mostra o efeito de diferentes concentrações de TNF-alfa - 5, 10, 15, 20 e 50 ng/mL – sobre o percentual de células LLC-MK2 e HEK293 infectadas pelo clone Col1.7G2, nos tempos de 2 e 22 horas de infecção. O número de amastigotas intracelulares em 100 células é indicado na Figura 11. Nossos dados mostram que o tratamento prévio com TNF-alfa não alterou a porcentagem de LLC-MK2 ou de HEK293 infectadas e o número de amastigotas intracelulares em 100 células, em qualquer das concentrações utilizadas.

Após 2 horas de infecção, observaram-se os seguintes valores percentuais médios de células LLC-MK2 infectadas: 33,7; 35,60; 32,53; 35,17 e 37,47%. Para células HEK293, observaram-se os seguintes percentuais médios: 24,54; 29,99, 23,34, 21,12 e 21,60%. No tempo de 22 horas, observaram-se os seguintes valores para células LLC-MK2: 23,10; 17,27; 17,63; 20,83 e 23,53%. Para células HEK-293, os valores são: 26,21; 28,23; 24,3; 24,92 e 25,46%.

Em relação ao numero de amastigotas em 100 células LLC-MK2, os valores observados para o tempo de 2 horas de infecção são: 176,23; 185,10; 177,87; 177,13 e 166,70. Para células HEK293, os valores observados em duas horas de infecção são: 134,33; 130,00; 124,33; 128,67 e 131,67.). Após 22 horas, as células LLC-MK2 exibiram os seguintes valores: 238,23, 212,70, 219,27, 223,40 e 227,17). Já as células KEK293 exibiram os valores médios: 150,00; 149,67; 142,67; 143,00 e 156,00).

A Figura 12, em conformidade com resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa e diferentemente do resultado encontrado pelo clone Col 1.7G2, mostra que células HEK293 quando infectadas pela cepa Y apresentam um número maior de amastigotas e uma maior porcentagem de células infectadas quando tratadas com 20ng/mL de TNF-alfa.

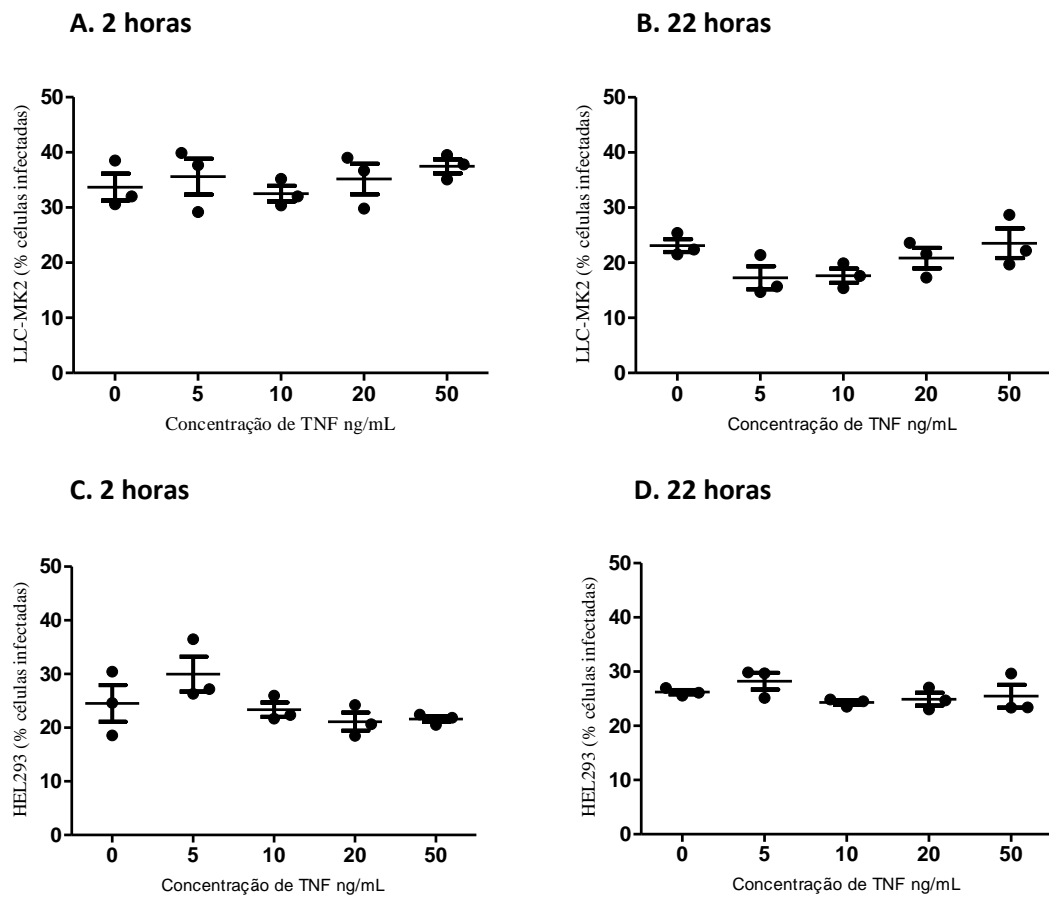


Figura 10. LLC-MK2 ou HEK293 infectadas com clone Col1.7G2 na proporção de 10 parasitos/célula e analisadas 2 (A) e 22 (B) horas após a infecção. Coloração por DAPI. Setas indicam amastigotas. (Aumento original de 4000x). $p \geq 0,05$. Teste Kruskal-Wallis.

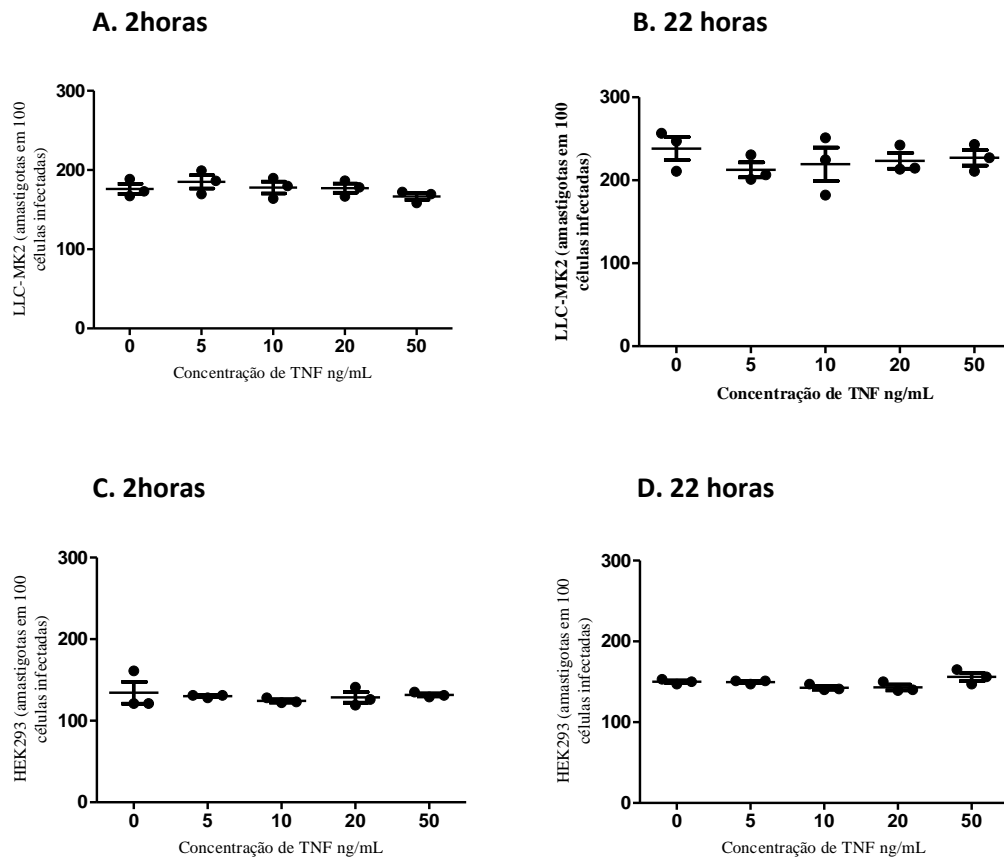


Figura 11. Número de amastigotas em 100 células LLC-MK2 ou HEK-293 após o pré tratamento com TNF-alfa e infectadas com clone COL.17G2 na proporção de 10 parasitos/célula, 2 e 22 horas após a infecção. Em (A) LLC-MK2, 2 horas após infecção, (B) LLC-MK2, 22 horas após infecção, (C) HEK-293, 2 horas após infecção e (D) HEK-293, 22 horas após infecção. ($p \geq 0,05$. Kruskal-Wallis).

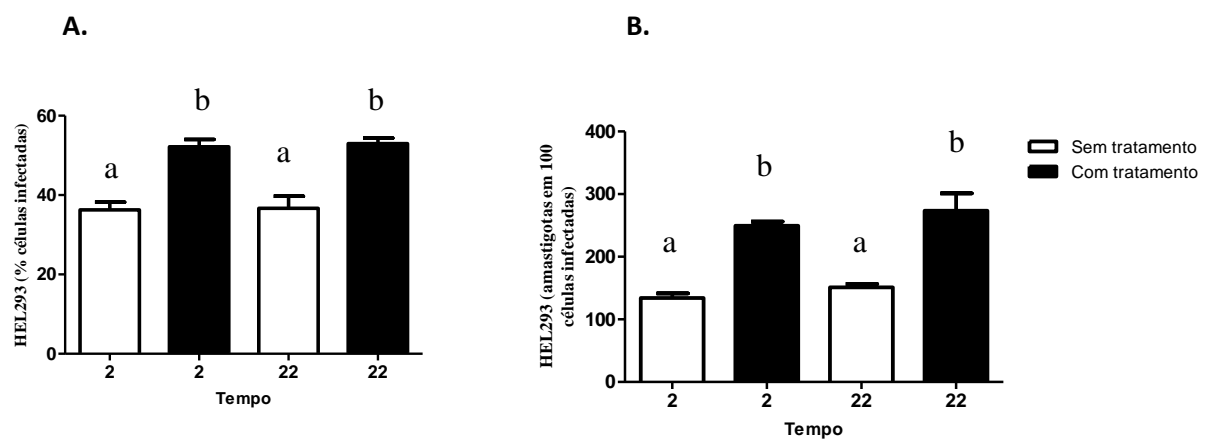
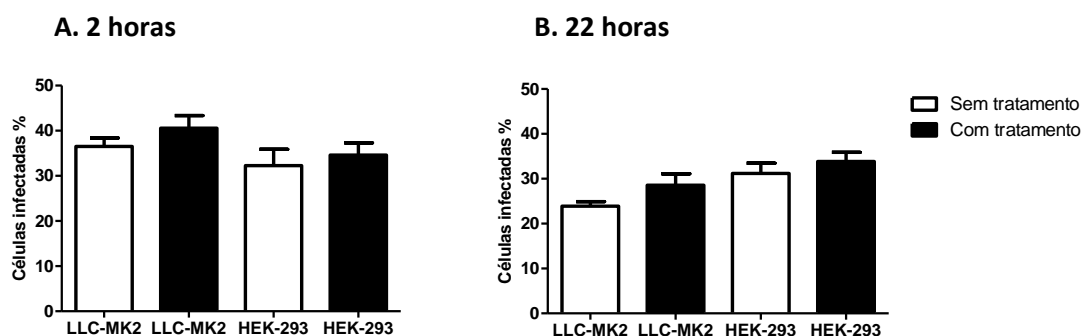


Figura 12. (A) Porcentagem de células infectadas e (B) Número de amastigotas em 100 células em HEK-293 sem ou após o pré tratamento com TNF-alfa e infectadas com clone Y na proporção de 10:1 parasitos/célula, 2 e 22 horas após a infecção ($p \geq 0,05$. One way ANOVA).

Como não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes concentrações de TNF-alfa, decidimos prosseguir os experimentos utilizando 20 ng/mL de TNF-alfa, assim como utilizado anteriormente, pelo nosso grupo de pesquisa, com células LLC-MK2 e HEK293 infectadas pela cepa Y.

O tratamento de células LLC-MK2 e HEK292 com 20ng/mL de TNF-alfa, previamente à infecção com o clone Col1.7G2, não alterou o percentual de células infectadas. O número de parasitos intracelulares também não se alterou de modo significativo em ambos os tipos celulares após tratamento com TNF-alfa.

No tempo de 2 horas após infecção, 43,82% das LLC-MK2 e 38,73% das HEK293 não tratadas foram infectadas pelo clone Col1.7G2. Para células tratadas, as porcentagens de infecção nesse tempo foram de 48,7% e 41,54% respectivamente. Em LLC-MK2 foram encontrados em média 214,14 e 199,8 199,8 e em HEK293 212,94 2 188,00 amastigotas intracelulares sem ou com tratamento com TNF-alfa respectivamente. No tempo de 22 horas após infecção, LLC-MK2 apresentavam-se 28,7% infectadas e com média de 267,9 amastigotas intracelulares em células sem tratamento pela citocina ou 34,28% e 275.36 respectivamente, em células tratadas. HEK293 apresentavam-se 37,42% infectadas e com média de 241,2 amastigotas intracelulares em 100 células sem tratamento pela citocina ou 40,61% e 233,40 respectivamente, em células tratadas (Figura 13).



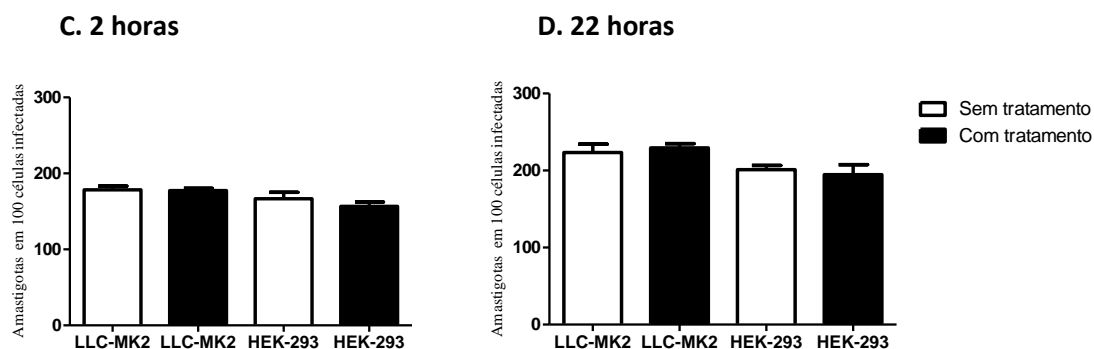


Figura 13. Percentual de células LLC-MK2 ou HEK 293 infectadas com o clone Col1.7G2 e número de amastigotas em 100 células, 2 e 22 horas após a infecção, tratadas ou não com 20ng/ml de TNF-alfa por 6 horas. (A) Percentual de células infectadas, após 2 horas de infecção. (B) Amastigotas em 100 células, após 2 horas de infecção. (C) Percentual de células infectadas, 22 horas após a infecção. (D) Amastigotas em 100 células após 22 horas de infecção. ($p \geq 0,05$. One-way analysis of variance).

5.4 Efeito do pré-tratamento com TNF-alfa sobre a infecção de LLC-MK2 e HEK-293 com o clone CL-Brener

O tratamento com diferentes concentrações - 5, 10, 15, 20 e 50 ng/mL - de TNF-alfa pelo período de 6 horas, previamente à infecção de células LLC-MK2 e HEK293 com o clone CL-Brener não resultou em diferença significativa no percentual de células infectadas (Figura 14) e no número de amastigotas intracelulares em 100 células (Figura 15).

A Figura 14 mostra o efeito de diferentes concentrações de TNF-alfa - 5, 10, 15, 20 e 50 ng/mL - sobre o percentual de células LLC-MK2 e HEK293 infectadas pelo clone CL Brener, nos tempos de 2 e 22 horas de infecção. O número de amastigotas intracelulares/100 células é indicado na Figura 15. Nossos dados mostram que o tratamento prévio com TNF-alfa não alterou a porcentagem de LLC-MK2 ou de HEK293 infectadas e o número de amastigotas intracelulares em 100 células, em qualquer das concentrações utilizadas.

Após 2 horas de infecção, observaram-se os seguintes valores percentuais médios de células LLC-MK2 infectadas: 12,65, 19,19, 17,49, 18,82 e 18,60%. Para células HEK293, observaram-se os seguintes percentuais médios: 35,67, 33,37, 30,50, 32,10 e 33,40%. No tempo de 22 horas, observaram-se os seguintes valores para células LLC-MK2: 17,90, 19,33, 15,75, 18,89 e 14,79%. Para células HEK-293, os valores são: 28,73, 35,17, 32,97, 28,27 e 30,3%.

Em relação ao número de amastigotas em 100 células LLC-MK2, os valores observados para o tempo de 2 horas de infecção são: 123,00, 124,33, 124,00, 126,67 e 128,00. Para células HEK293, os valores observados em duas horas de infecção são: 131,00, 134,33, 128,33, 132,00, 132,67 e 132,67). Após 22 horas, as células LLC-MK2 exibiram os seguintes valores: 127,68, 137,33, 139,67, 145,67 e 130,66). Já as células KEK293 exibiram os valores médios: 157,33, 157,33, 163,67, 151,67 e 165,33).

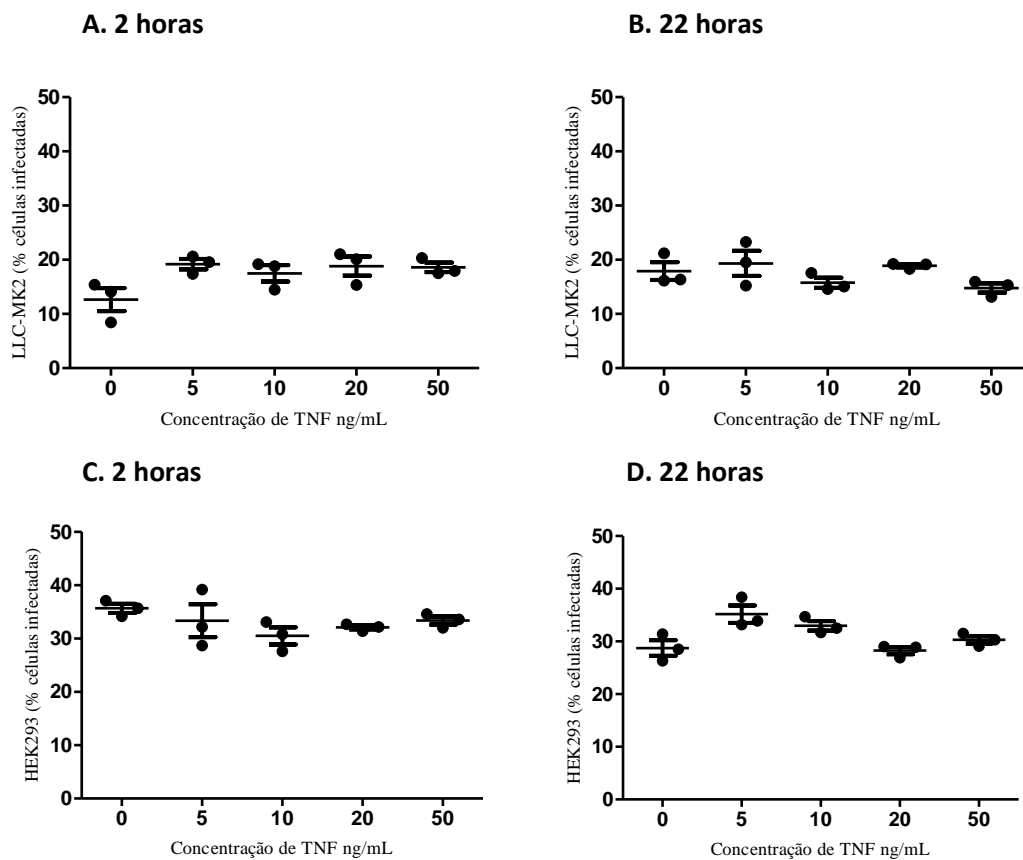


Figura 14. Porcentagem de LLC-MK2 ou HEK-293 pré tratadas com TNF-alfa e infectadas com clone CL Brener na proporção de 10 parasitos /célula, 2 e 22 horas após a infecção. (A) LLC-MK2, 2 horas após infecção, (B) LLC-MK2, 22 horas após infecção, (C) HEK-293, 2 horas após infecção e (D) HEK-293, 22 horas após infecção. ($p \geq 0,05$. Kruskal-Wallis).

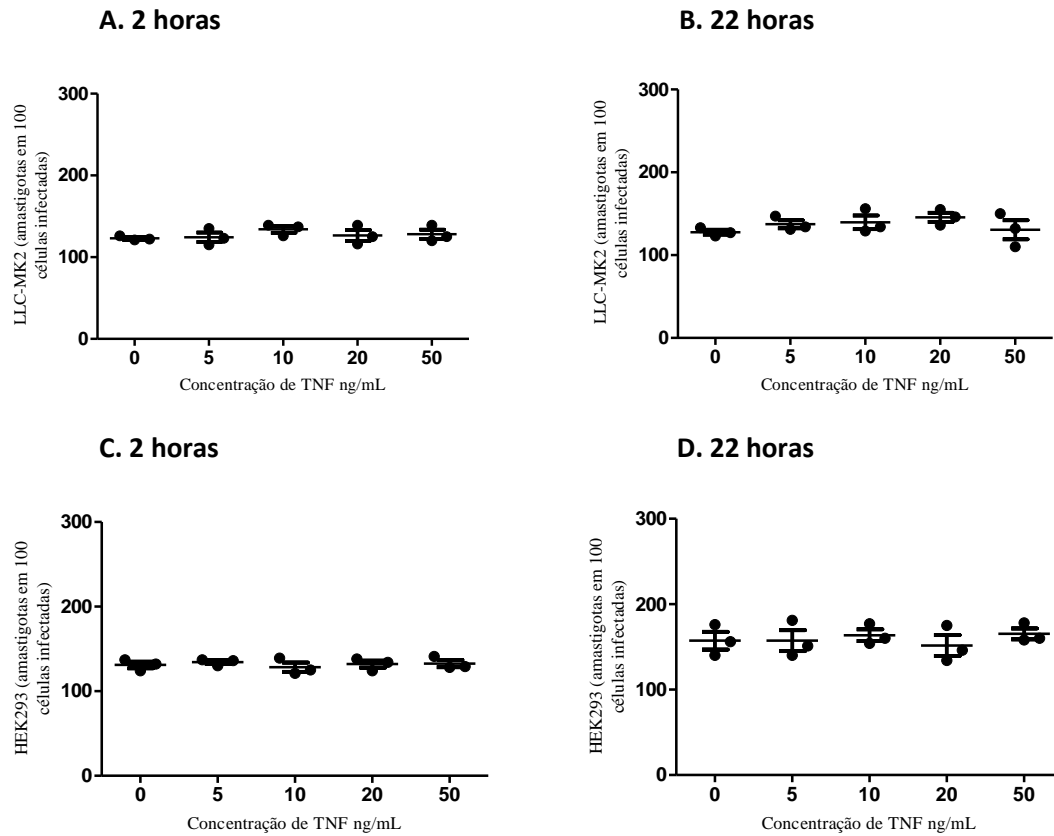


Figura 15. Número de amastigotas em 100 células LLC-MK2 ou HEK-293 pré tratadas com TNF-alfa e infectadas pelo clone CL Brener na proporção de 10 parasitos/célula, 2 e 22 horas após a infecção. Em (A) LLC-MK2, 2 horas após infecção, (B) LLC-MK2, 22 horas após infecção, (C) HEK-293, 2 horas após infecção e (D) HEK-293, 22 horas após infecção. ($p \geq 0,05$. Kruskal-Wallis).

Tendo em vista esses resultados e a pertinência de se usar concentração semelhante à utilizada nos experimentos com o clone Col1.7G2, utilizou-se a concentração de 20 ng/mL de TNF-alfa nos experimentos descritos a seguir com o clone CL-Brener.

De modo interessante, os experimentos com o clone CL-Brener indicaram que o percentual de células infectadas, assim como o número de parasitos/100 células atingem valores significativamente maiores com as células HEK293 quando comparadas com as células LLC-MK2 (Figuras 16 e 17).

No tempo de 2 horas após infecção, foi possível obter os valores médios de 16,16% e 17,33% para LLC-MK2 não tratadas e tratadas com TNF-alfa, respectivamente e 38,47% e 33,33% para HEK293, nas mesmas condições. No tempo de 22 horas após infecção, foram encontradas as médias de 12,65% e 12,02% para LLC-MK2 não tratadas e tratadas com TNF-alfa, respectivamente e, 26,73% e 23,73% para HEK293 nas mesmas condições.

Com relação ao número de amastigotas intracelulares, no tempo de 2 horas após infecção foram encontradas em média 115,50 e 121,67 em LLC-MK2 não tratadas e tratadas com TNF-alfa, respectivamente. Em HEK293 nas mesmas condições foram encontradas em média 142,00 e 142,67 amastigotas intracelulares. Em 22 horas após infecção, estes valores foram de 124,5 e 121,5 para LLC-MK2 e 155,83 e 146,17 para HEK293, não tratadas ou tratadas com TNF-alfa, respectivamente.

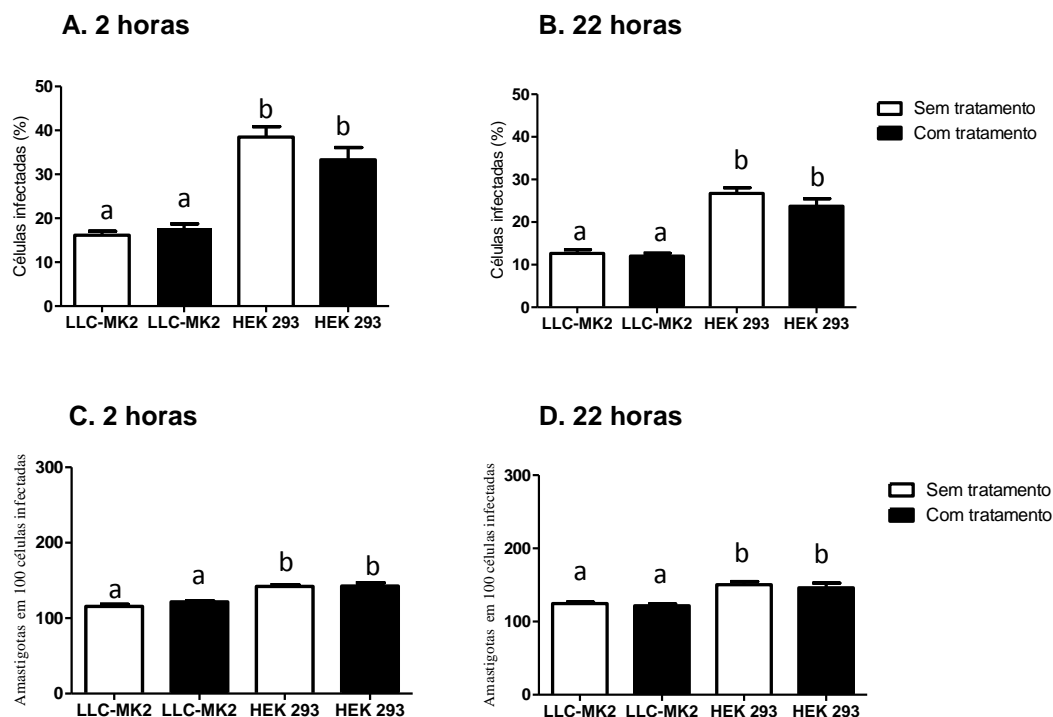
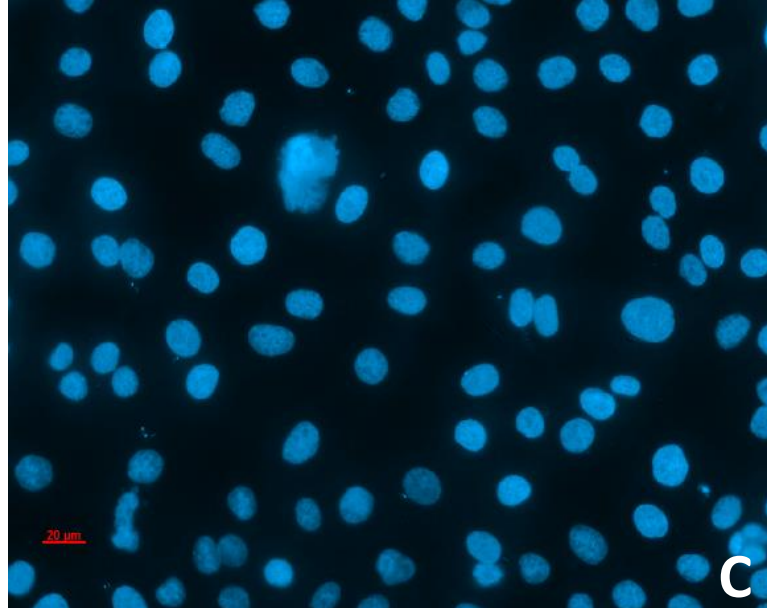
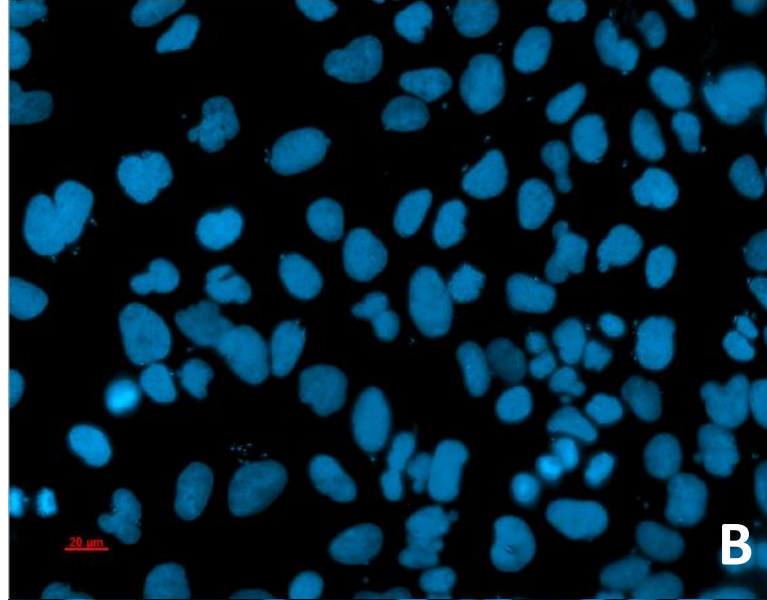
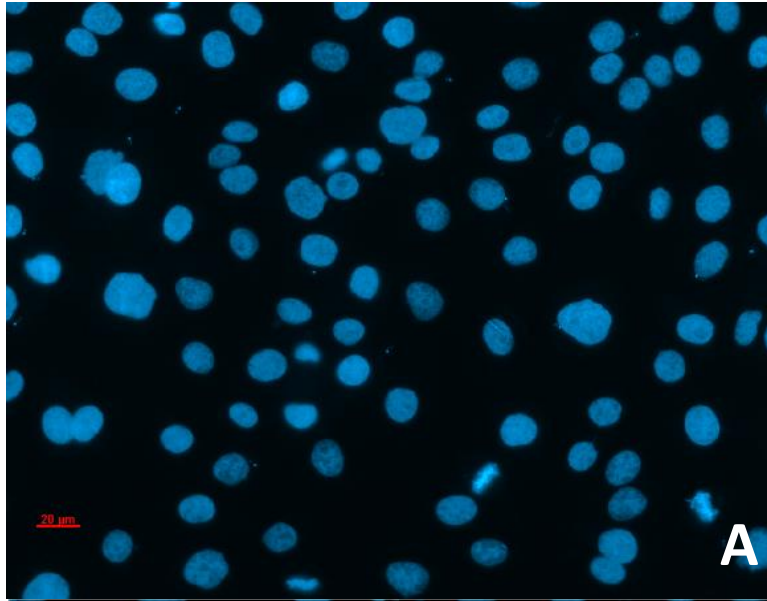
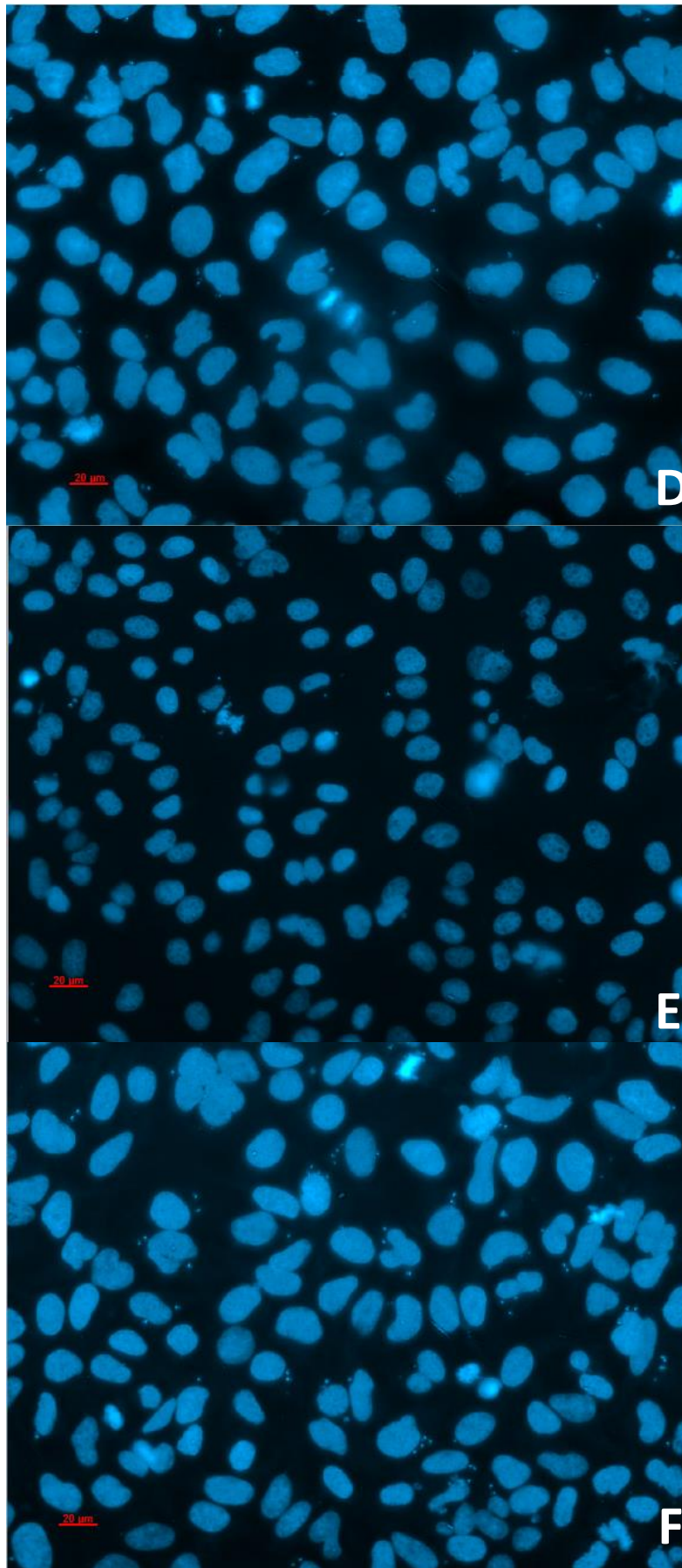
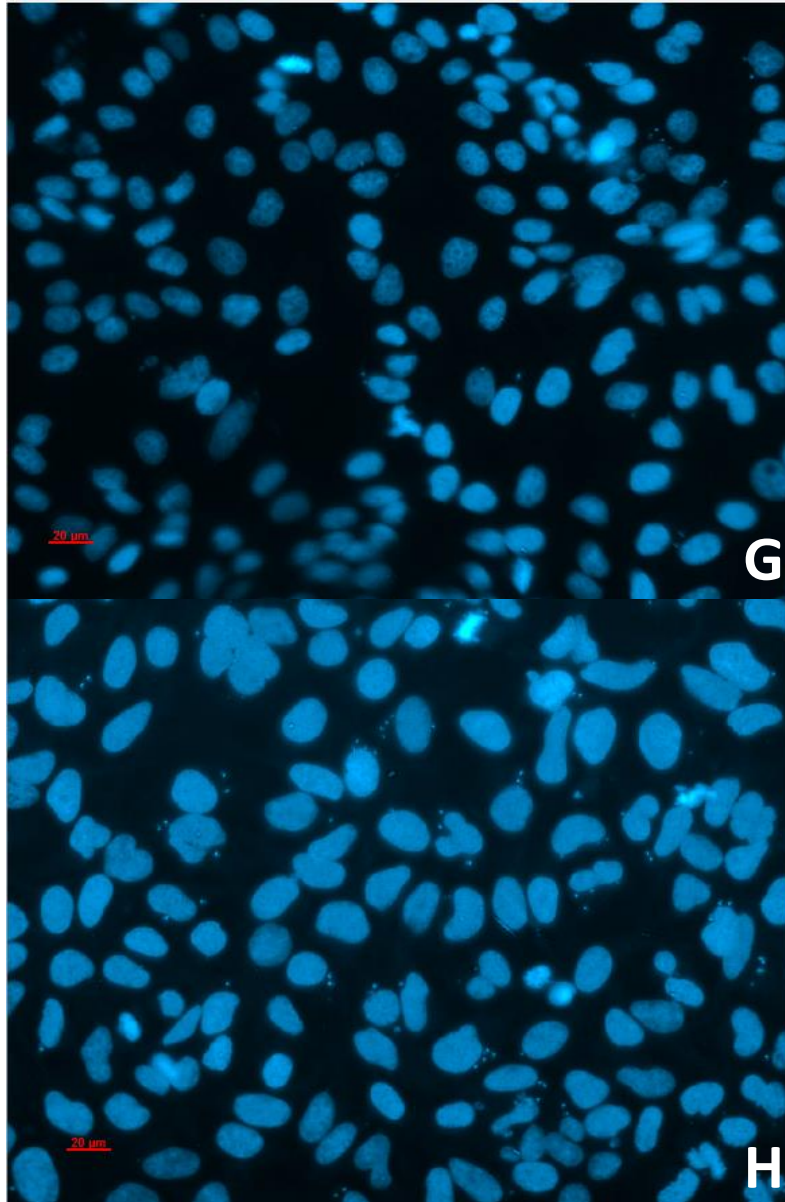


Figura 16. Porcentagem de infecção e número de amastigotas em células LLC-MK2 ou HEK 293 infectadas pelo clone CL Brener, 2 e 22 horas após infecção sem tratamento ou com tratamento de 20ng/mL de TNF-alfa. (A) LLC-MK2, 2 horas após infecção, (B) LLC-MK2, 22 horas após infecção, (C) HEK-293, 2 horas após infecção e (D) HEK-293, 22 horas após infecção. (Letras diferentes representam resultados significativos, $p < 0,05$. One-way analysis of variance).

Figura 17. Células LLC-MK2 ou HEK293 infectadas apresentam padrões de infecção diferentes para o clone CL Brener. (A) LLC-MK2, 2h após a infecção e sem pré tratamento com TNF-alfa. (B) HEK293, 2 horas após a infecção e sem pré tratamento com TNF-alfa. (C) LLC-MK2, 2h após a infecção e com pré tratamento de 20 ng/mL TNF-alfa. (D) HEK293, 2 horas após a infecção e com pré tratamento de 20 ng/mL TNF-alfa. (E) LLC-MK2, 22h após a infecção e sem pré tratamento com TNF-alfa. (F) HEK293, 22h após a infecção e sem pré tratamento com TNF-alfa. (G) LLC-MK2, 22h após a infecção e com pré tratamento de 20 ng/mL TNF-alfa. (H) HEK293, 22 horas após a infecção e com pré tratamento de 20 ng/mL TNF-alfa. (Aumento original de 4000x):







5.5 Infecção de LLC-MK2 pelos clones CL Brener e Col1.7G2

Observamos que em células LLC-MK2 (Figura 18) ocorre uma maior infecção pelo clone Col1.7G2 (TCI) quando comparamos a infecção pelo clone CL Brener (TCVI). O mesmo é observado para o número de amastigotas intracelulares. Esses resultados foram encontrados para ambos os tempos de infecção. No tempo de 2 horas após a infecção por CL Brener, as médias encontradas de infecção foram de 16,73% e 17,73% e a média de amastigotas intracelulares foi de 115,50 e 121,67, para células não tratadas ou tratadas respectivamente. No tempo de 22 horas após a infecção por CL Brener, as médias encontradas de infecção foram de 12,65% e 12,01% e a média de amastigotas intracelulares foi de 124,50 e 121,50, para células não tratadas ou tratadas respectivamente. No tempo de 2 horas após a infecção por Col1.7G2, as médias encontradas de infecção foram de 36,51% e 40,58% e a média de amastigotas intracelulares foi de 178,45 e 177,45, para células não tratadas ou tratadas respectivamente. No tempo de 22 horas após a infecção por Col1.7G2, as médias encontradas de infecção foram de 23,92% e 28,57% e a média de amastigotas intracelulares foi de 223,50 e 229,47, para células não tratadas ou tratadas respectivamente.

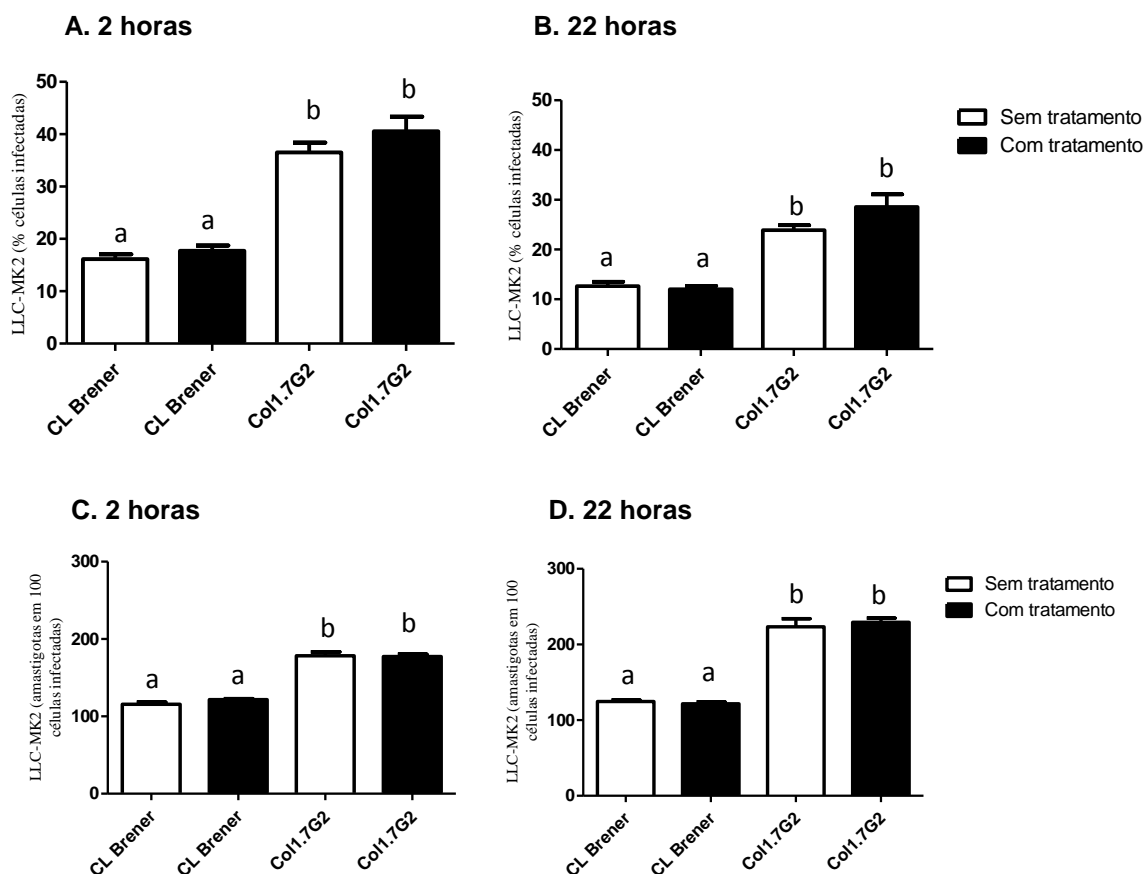


Figura 18. LLC-MK2 pré tratadas ou não pré tratadas com TNF-alfa e infectadas com os clones CL Brener ou Col1.7G2. (A) Porcentagem de células infectadas, 2 horas após a infecção. (B) Número de amastigotas em 100 células infectadas, 2 horas após infecção. (C) Porcentagem de células infectadas, 22 horas após a infecção. (D) Número de amastigotas em 100 células infectadas, 22 horas após a infecção. (Letras diferentes indicam resultado significativo $p > 0,05$. One-way analysis of variance).

5.7 Infecção de HEK293 pelos clones CL Brener e Col1.7G2

Assim como a LLC-MK2, as HEK293 (Figura 19) também são mais infectadas pelo clone Col1.7G2 e também apresentam maior número de amastigotas intracelulares por 100 células infectadas, porém diferente das células LLC-MK2 estas diferenças são observadas apenas no período de 22 horas após a infecção. No tempo de 2 horas após a infecção por CL Brener, as médias encontradas de infecção foram de 38,47% e 33,33% e a média de amastigotas intracelulares foi de 142,00 e 142,67, para células não tratadas ou tratadas respectivamente. No tempo de 22 horas após a infecção por CL Brener, as médias encontradas de infecção foram de 26,73% e 23,73% e a média de amastigotas intracelulares foi de 150,4 e 146,17, para células não tratadas ou tratadas respectivamente. No tempo de 2 horas após a infecção por Col1.7G2, as médias

encontradas de infecção foram de 32,27% e 34,62% e a média de amastigotas intracelulares foi de 161,0 e 156,67, para células não tratadas ou tratadas respectivamente. No tempo de 22 horas após a infecção por Col1.7G2, as médias encontradas de infecção foram de 31,18% e 33,84% e a média de amastigotas intracelulares foi de 201,00 e 194,5, para células não tratadas ou tratadas respectivamente.

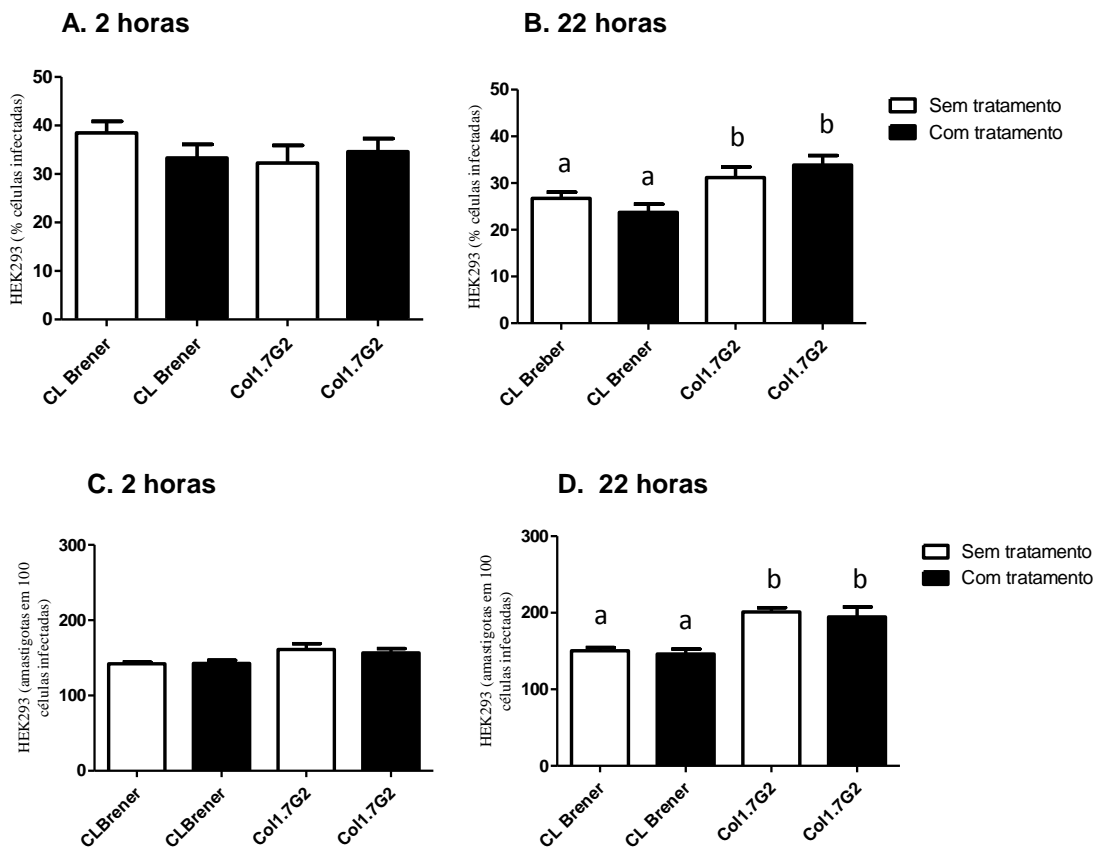


Figura 19. HEK293 pré tratadas ou não pré tratadas com TNF- α e infectadas com os clones CL Brener ou Col1.7G2. (A) Porcentagem de células infectadas, 2 horas após a infecção. (B) Número de amastigotas em 100 células infectadas, 2 horas após a infecção. (C) Porcentagem de células infectadas, 22 horas após a infecção. (D) Número de amastigotas em 100 células infectadas, 22 horas após a infecção. (Letras diferentes indicam resultado significativo, $p > 0,05$. One-way analysis of variance).

5.8 Ultraestrutura de LLC-MK2 infectadas com os clones CL Brener ou Col1.7G2

Os resultados apresentados a seguir referem-se à infecção de células LLC-MK2 com os clones Col1.7G2 ou CL-Brener, previamente tratadas ou não com TNF-alfa.

Células LLC-MK2 controles - não infectadas e não tratadas com TNF-alfa – apresentaram-se bem preservadas após processamento de rotina para microscopia eletrônica de transmissão. De modo geral, essas células apresentaram núcleo vesiculoso com nucléolo proeminente e heterocromatina finamente granulosa. No citoplasma foi possível observar muitos perfis mitocondriais, cisternas do retículo endoplasmático granular e delicado sistema de endomembranas lisas com vesículas de tamanho variável (Figura 20).

A análise de células não infectadas e tratadas com TNF-alfa mostrou que essas células apresentaram-se bem preservadas, sem alterações nucleares e citoplasmáticas indicativas de degeneração ou perda de viabilidade (Figura 21).

A principal alteração estrutural observada nas células LLC-MK2 infectadas com qualquer um dos clones é a proximidade das mitocôndrias em relação aos parasitos. Muitas vezes, as mitocôndrias foram observadas em íntima justaposição com a membrana dos parasitos. Essa configuração foi observada tanto nas células tratadas quanto nas células não submetidas ao tratamento com TNF-alfa previamente à infecção. Os parasitos foram facilmente identificados pela sua morfologia característica, com presença de microtúbulos subplasmalêmicos e cinetoplasto. Outra alteração observada, mas com menor frequência, é a justaposição de cisternas lisas à membrana dos parasitos. As Figuras 22 a 25 mostram essas alterações.

A figura 26 mostra que as células LLC-MK2 controles - não infectadas e não tratadas (A), não infectadas e tratadas com TNF-alfa (B) preparadas por *flat embedding* também apresentaram-se preservadas, com núcleo vesiculoso, nucléolo proeminente e heterocromatina finamente granulosa. Essa análise confirmou os resultados obtidos com a preparação das células em pellets, no que se refere à justaposição de mitocôndrias à membrana dos parasitos, tanto da forma amastigota (C e D) como da forma tripomastigotas (E e F).

Figura 20. Imagens representativas de células LLC-MK2 controles, não tratadas com TNF e não infectadas com *T. cruzi*. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12. As células apresentam núcleo vesiculoso (N) com nucléolo proeminente (Nu). O citoplasma é rico em perfis mitocondriais (m) e em elementos do sistema de endomenbranas (setas).

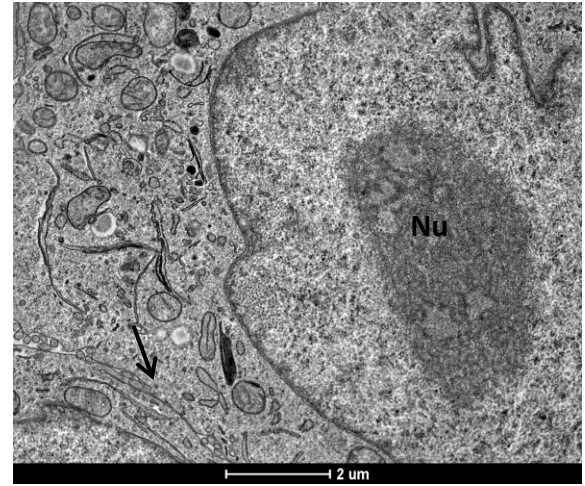
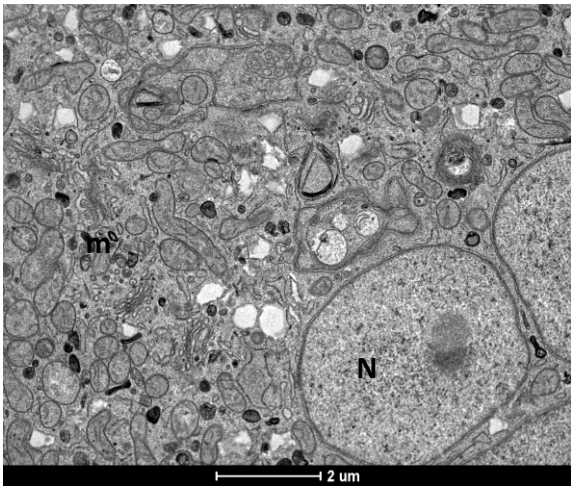
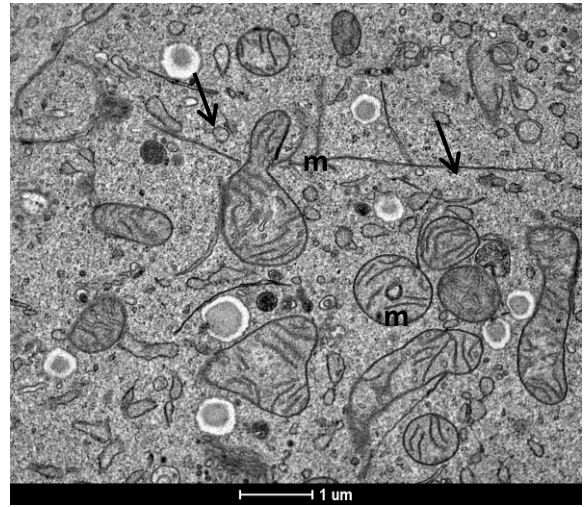
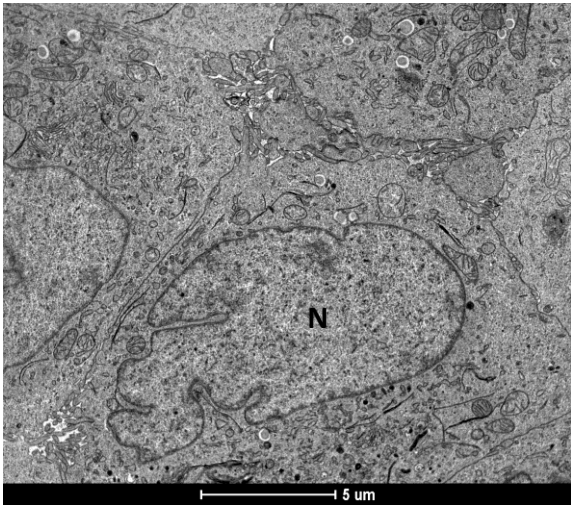
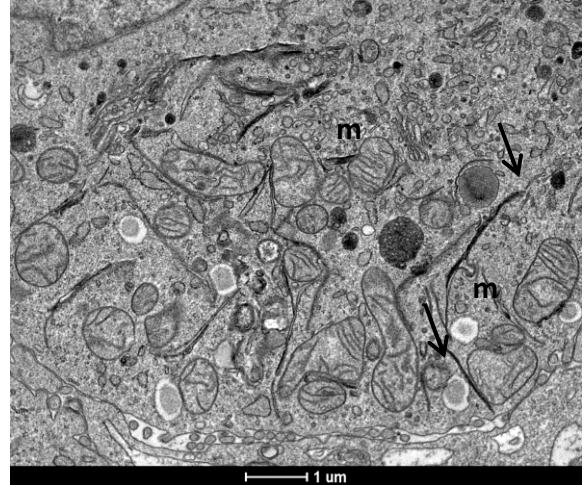
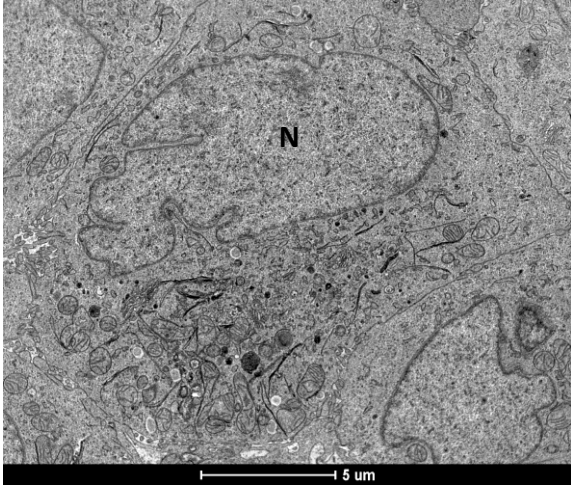


Figura 21. As imagens correspondem ao período de 2 horas de infecção em LLC-MK2. Os parasitos são facilmente reconhecidos pela disposição característica de microtúbulos abaixo da membrana plasmática. Observam-se acúmulo de perfis mitocondriais próximo ao parasito. Muitas vezes, as mitocôndrias apresentavam-se justapostas à membrana plasmática do parasito.

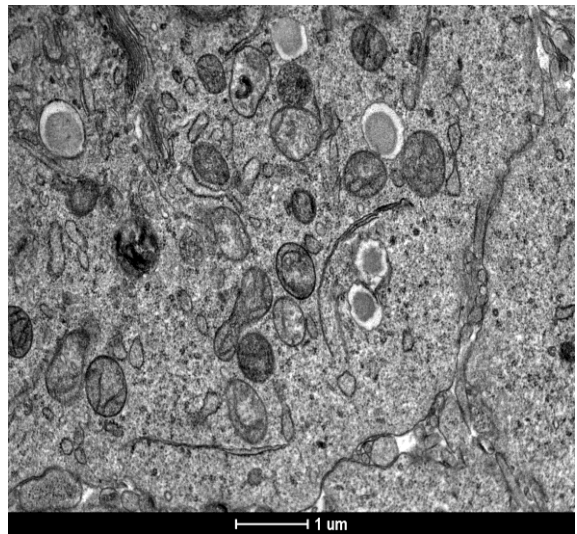
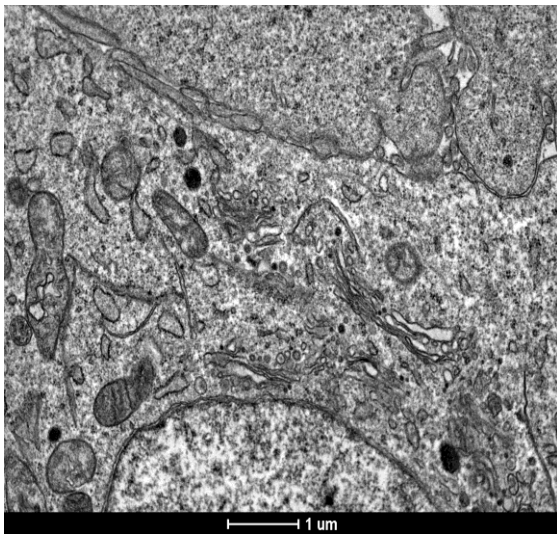
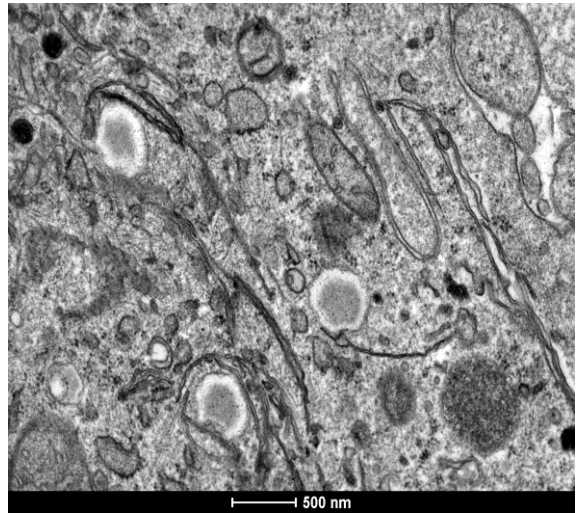
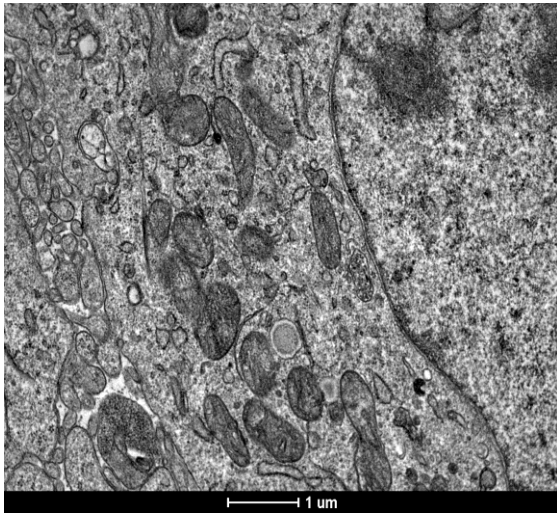
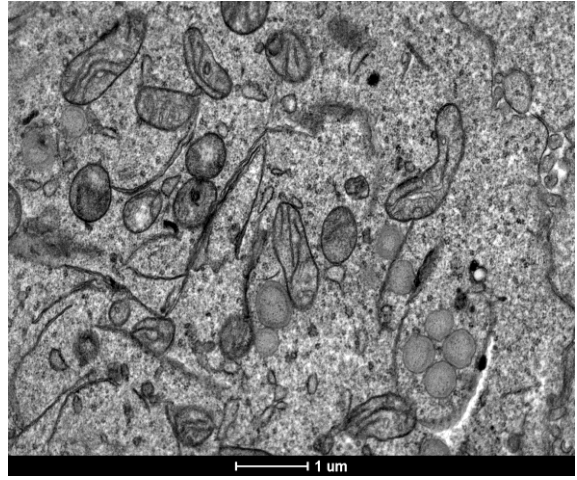
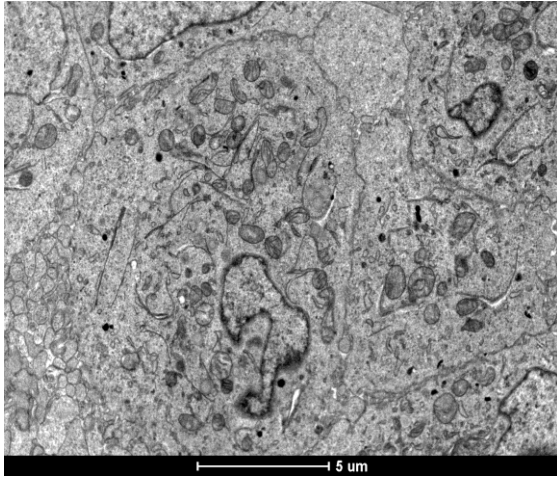


Figura 22 As imagens correspondem ao período de 2 horas de infecção em LLC-MK2. Os parasitos são facilmente reconhecidos pela disposição característica de microtúbulos abaixo da membrana plasmática. Observam-se acúmulo de perfis mitocondriais próximo ao parasito. Muitas vezes, as mitocôndrias apresentavam-se justapostas à membrana plasmática do parasito.

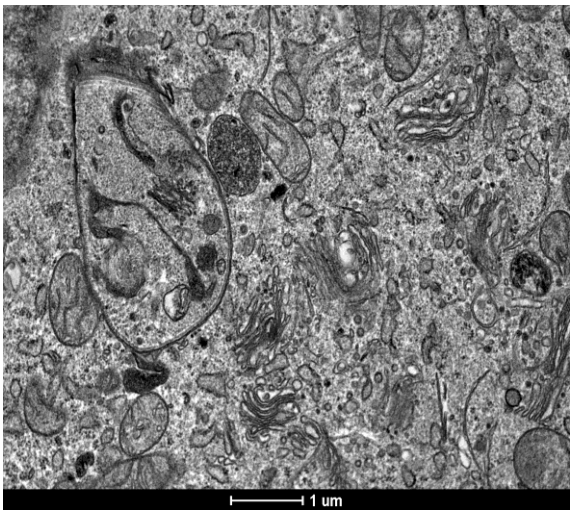
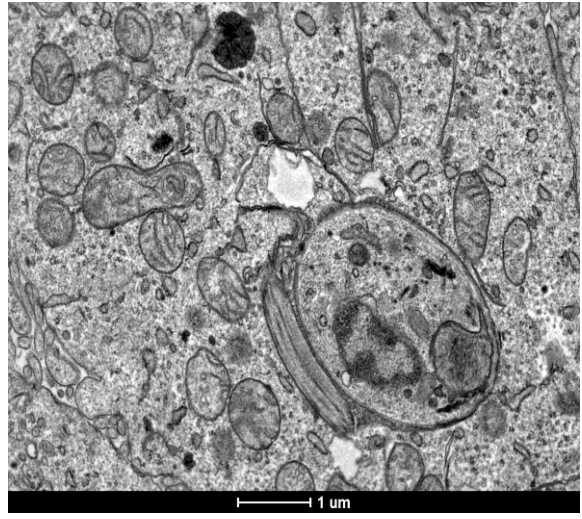
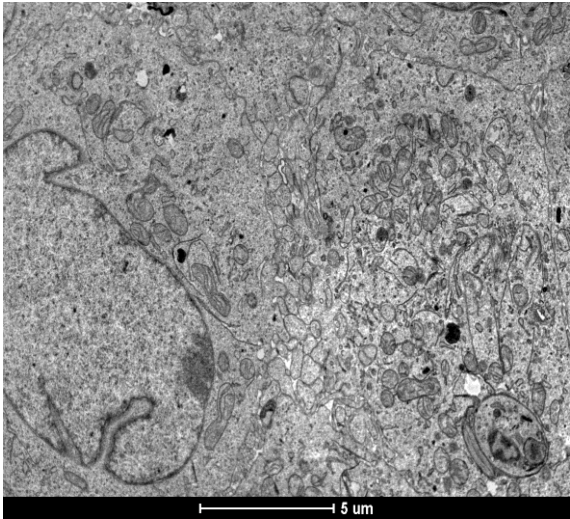
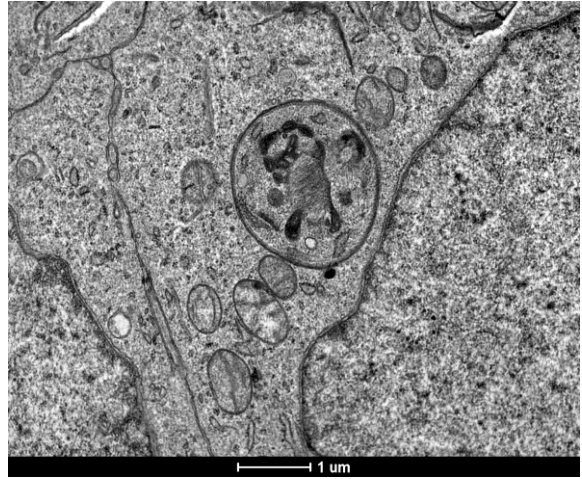
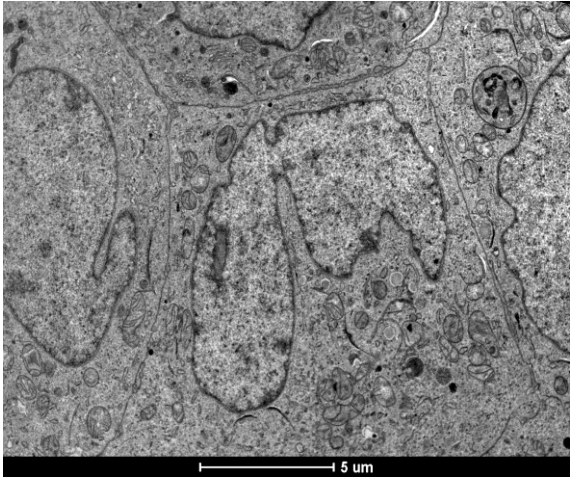


Figura 23. Imagens representativas de células LLC-MK2 tratadas com TNF por seis horas e infectadas com o clone CL Brener de *T. cruzi*. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12. As imagens correspondem ao período de 2 horas de infecção. Alguns dos parasitos ainda apresentam flagelo visível (seta). Observa-se acúmulo de perfis mitocondriais próximo ao parasito.

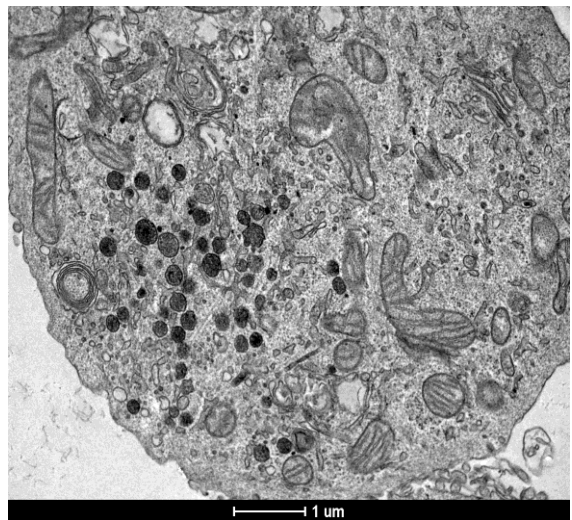
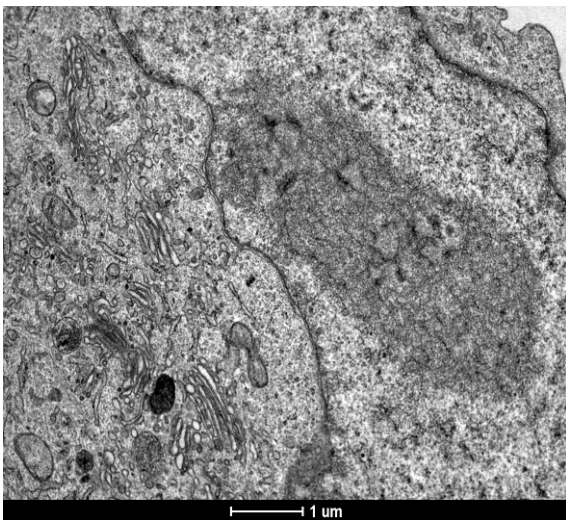
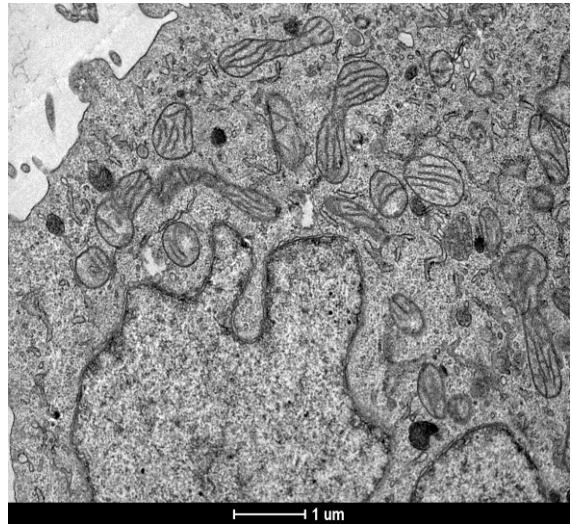
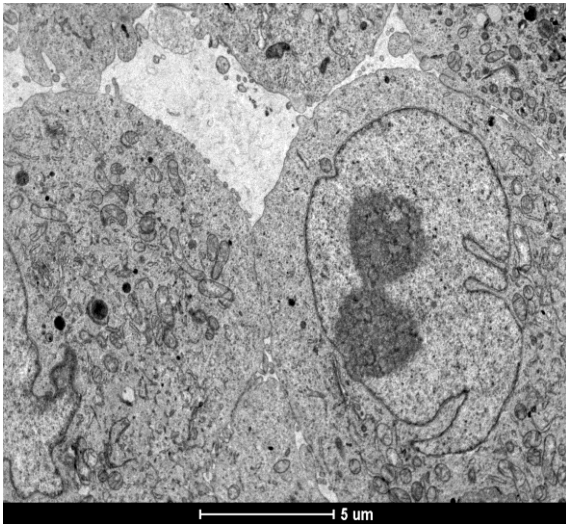
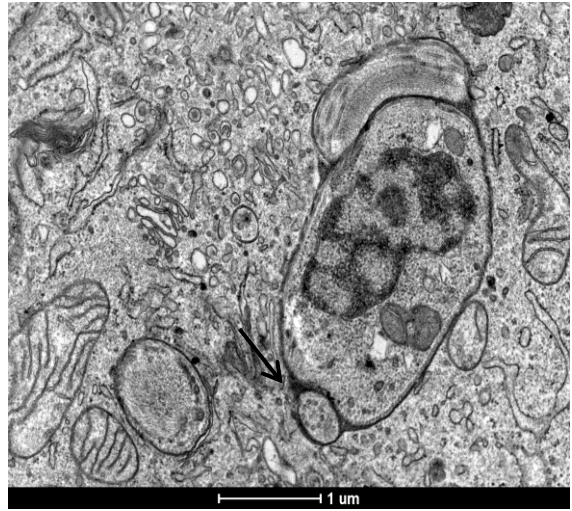
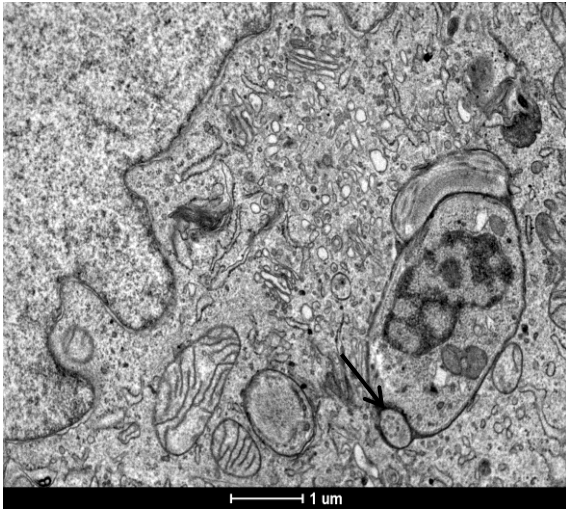


Figura 24 Imagens representativas de células LLC-MK2 controles, não tratadas com TNF e não infectadas com *T. cruzi*. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12. As células apresentam nucléolo proeminente (Nu) com citoplasma rico em perfis mitocondriais (m).

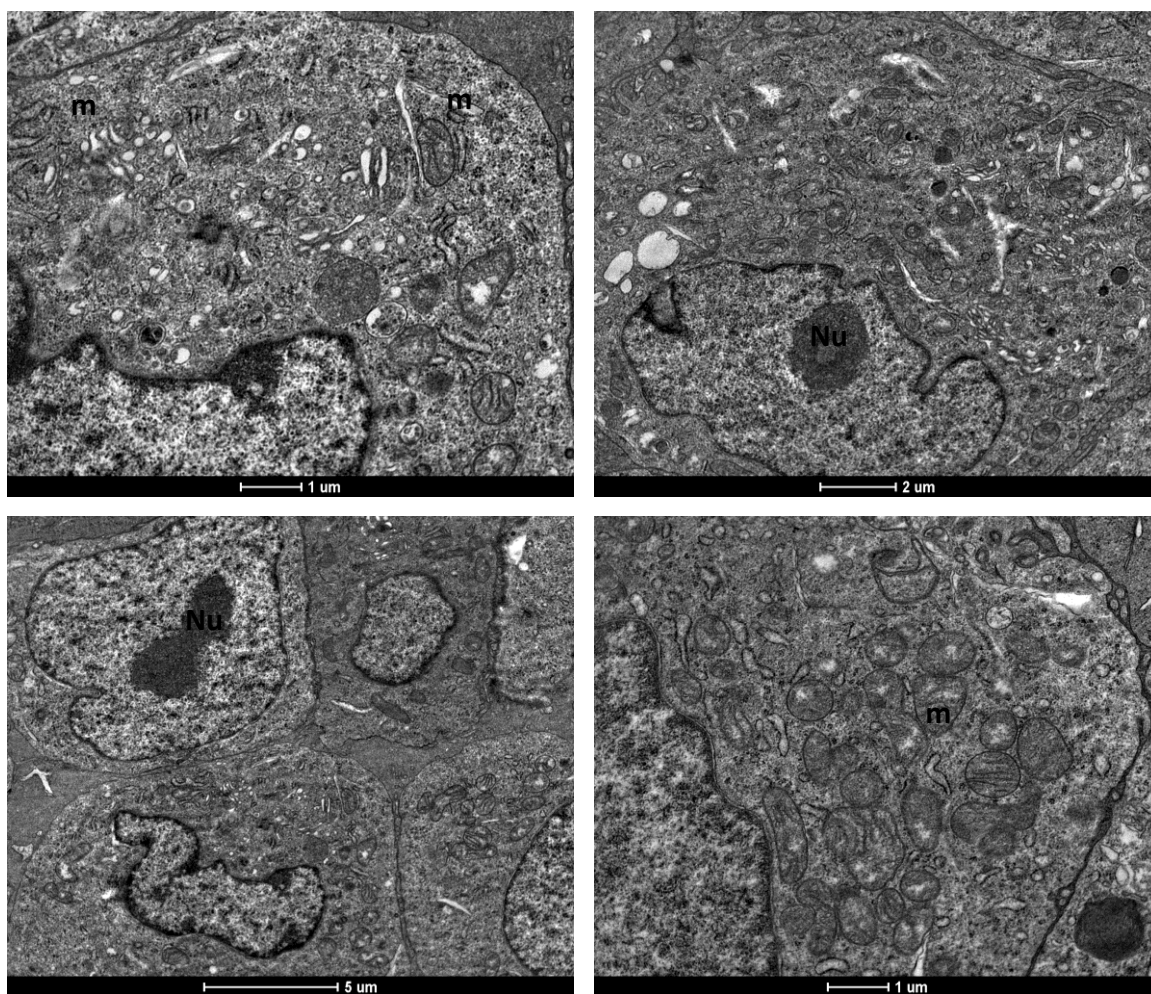


Figura 25. Imagens representativas de células LLC-MK2 controles tratadas com TNF por 6 horas. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12. As células apresentam-se com filopódios (f) e corpos lipídicos (setas)..

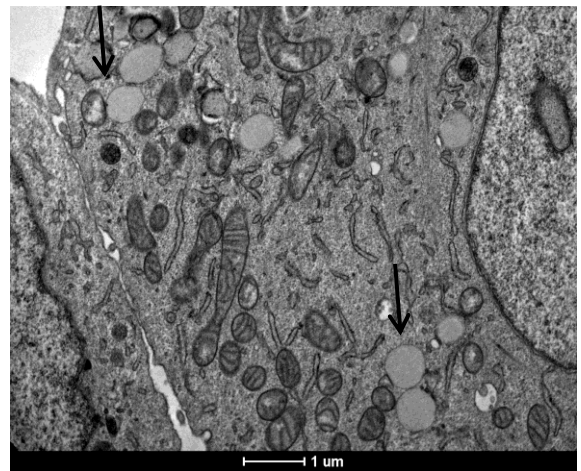
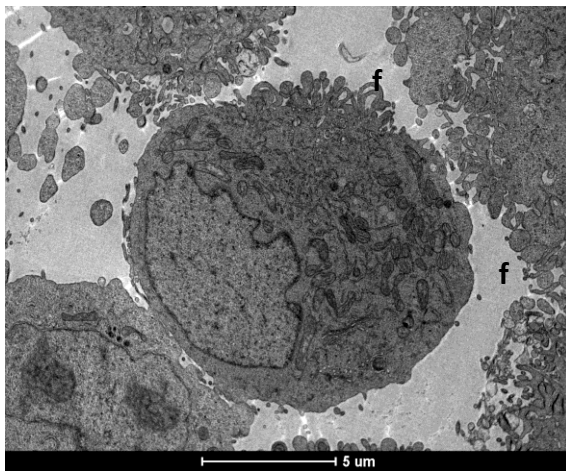
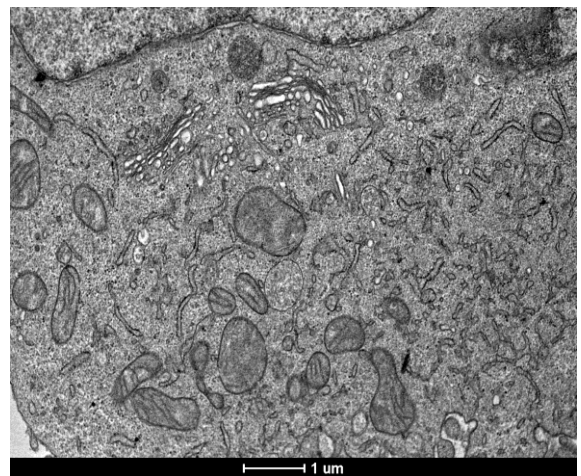
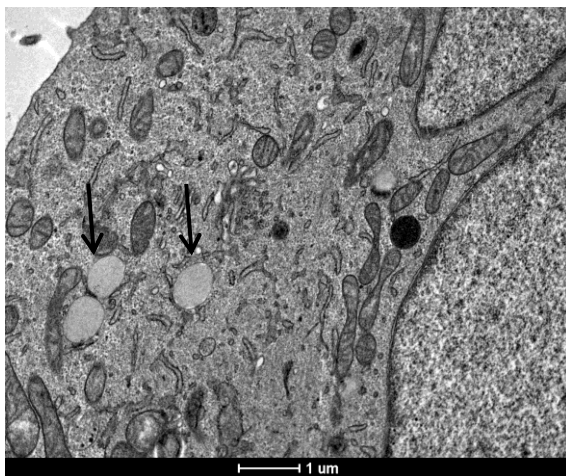
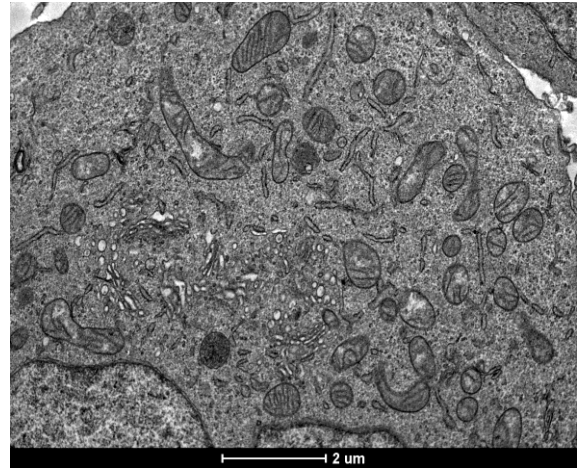
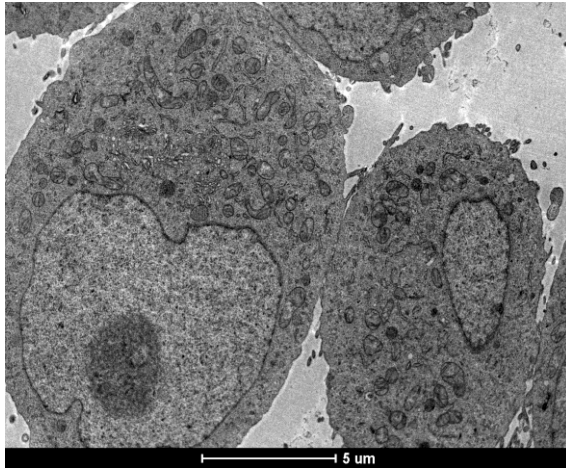


Figura 26 a. As imagens correspondem ao período de 22 horas de infecção com o clone Col1.7G2 de *T. cruzi*. Os parasitos são facilmente reconhecidos pela disposição característica de microtúbulos abaixo da membrana plasmática. Observam-se acúmulo de perfis mitocondriais próximo ao parasito. Muitas vezes, as mitocôndrias apresentavam-se justapostas à membrana plasmática do parasito.

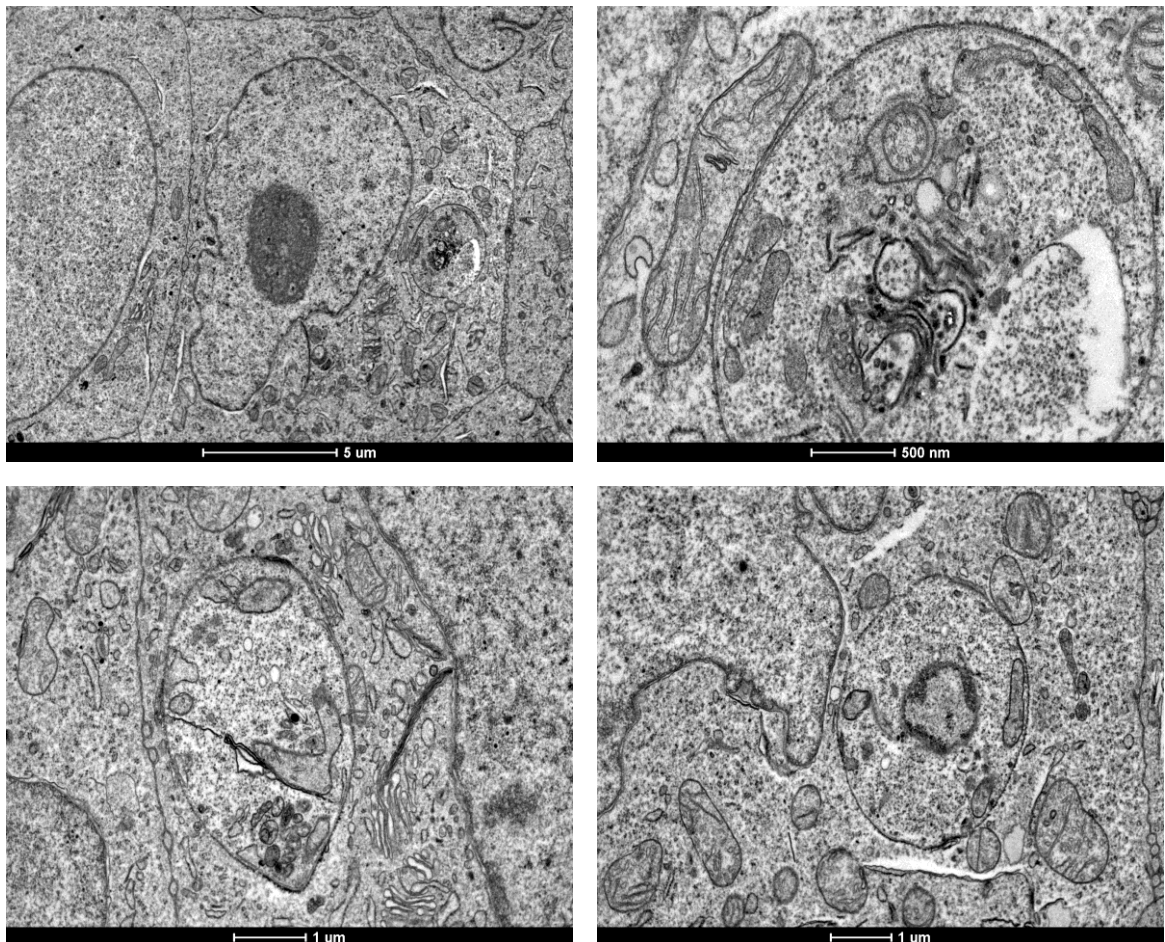


Figura 26 b. As imagens correspondem ao período de 22 horas de infecção com o clone Col1.7G2 de *T. cruzi*. Os parasitos são facilmente reconhecidos pela disposição característica de microtúbulos abaixo da membrana plasmática. Observam-se acúmulo de perfis mitocondriais próximo ao parasito. Muitas vezes, as mitocôndrias apresentavam-se justapostas à membrana plasmática do parasito.

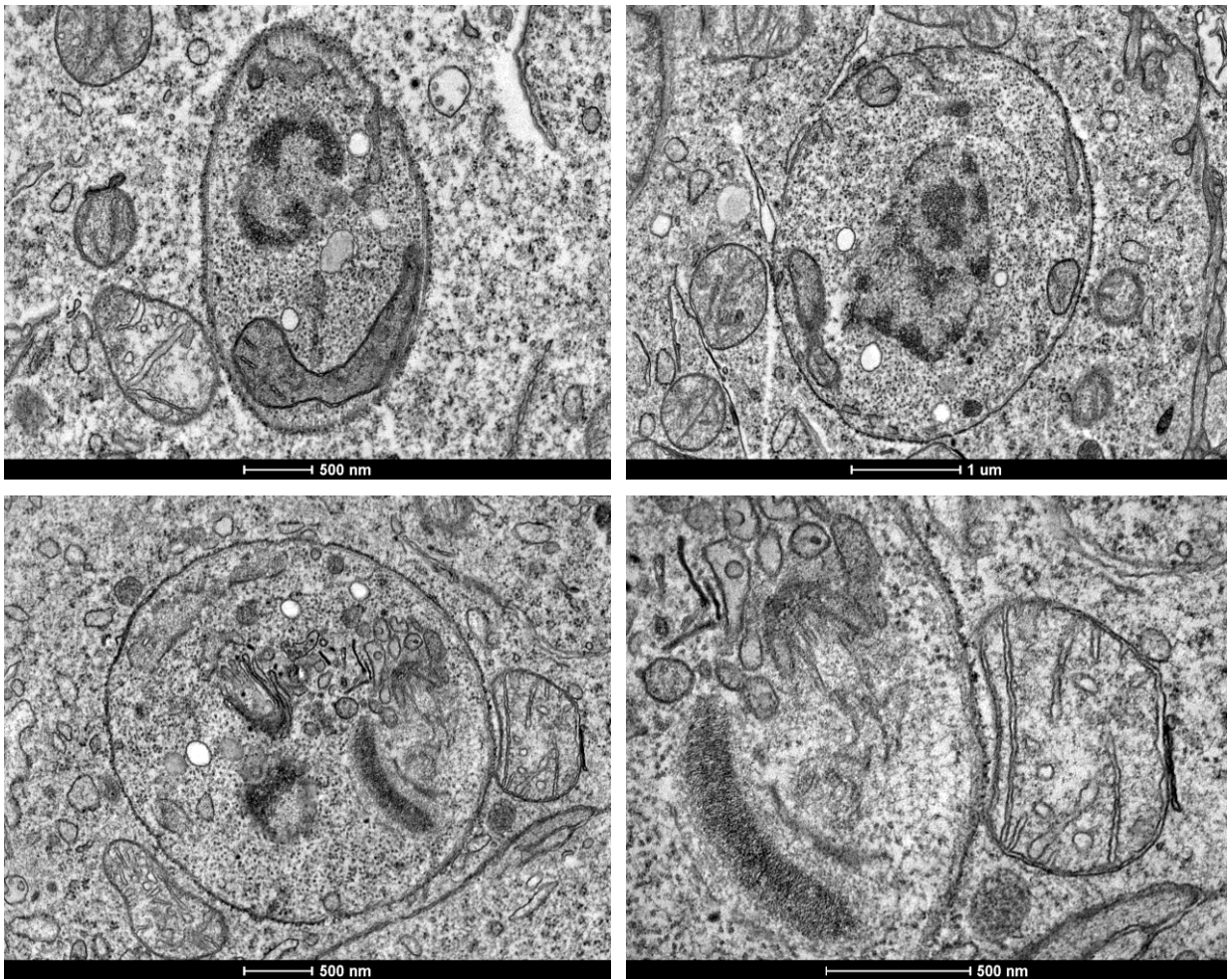


Figura 27. As imagens correspondem ao período de 22 horas de infecção com o clone CL-Brener de *T. cruzi*. Ocorre acúmulo de perfis mitocondriais próximo ao parasito.

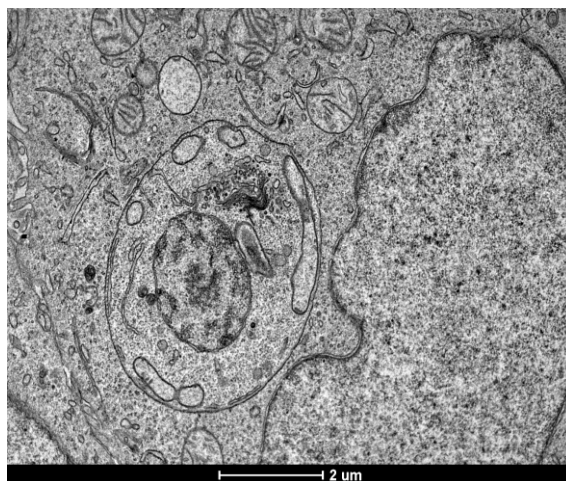
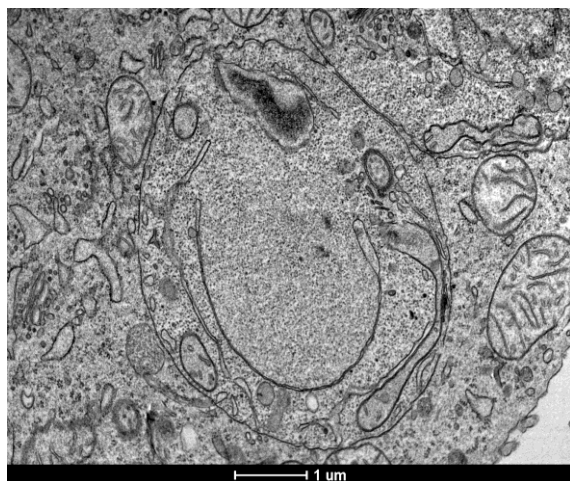


Figura 28. Imagens representativas de células LLC-MK2 tratadas com TNF por 6 horas e infectadas com o clone Col1.7g2 de *T. cruzi*. As mitocôndrias acumulavam-se próximas ao parasito e apresentavam-se justapostas à membrana plasmática do parasito.

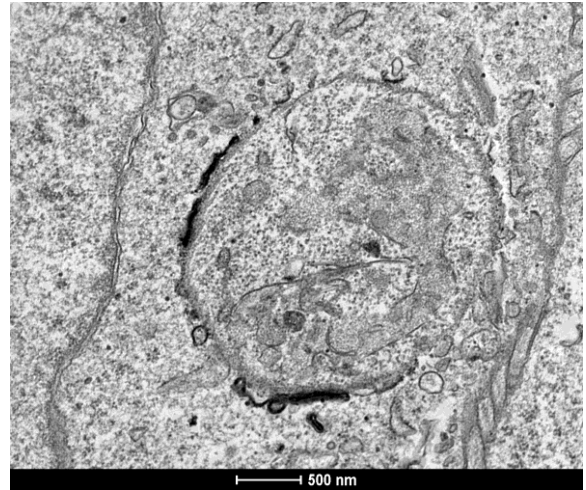
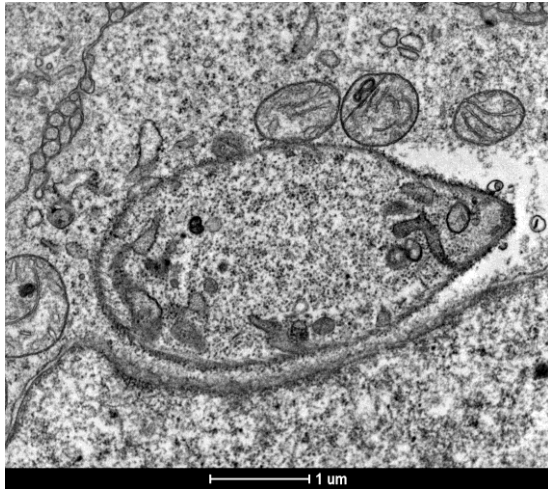


Figura 29. Imagens representativas de células LLC-MK2 tratadas com TNF por 6 horas e infectadas com o clone CL-Brener de *T. cruzi*. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12. As imagens correspondem ao período de 22 horas de infecção. Mitocôndrias próximas ao parasito.

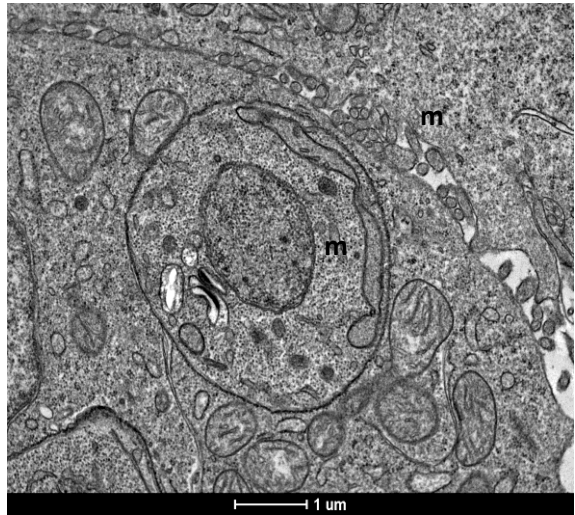
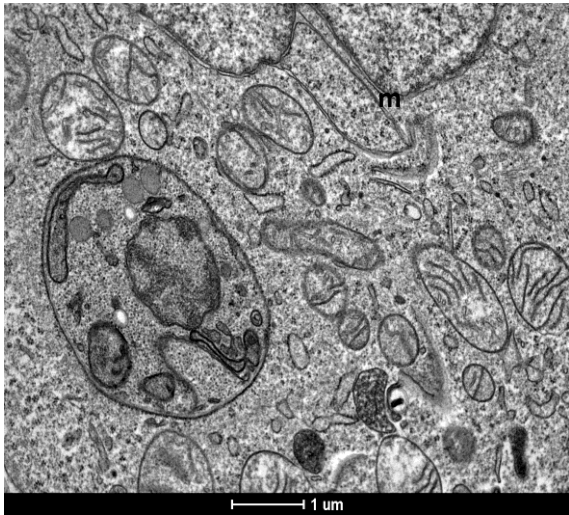
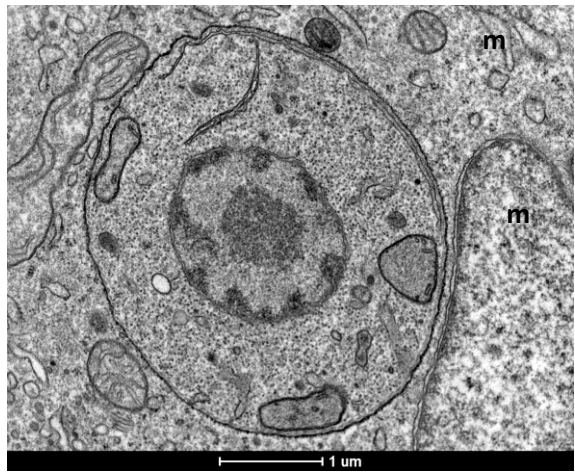
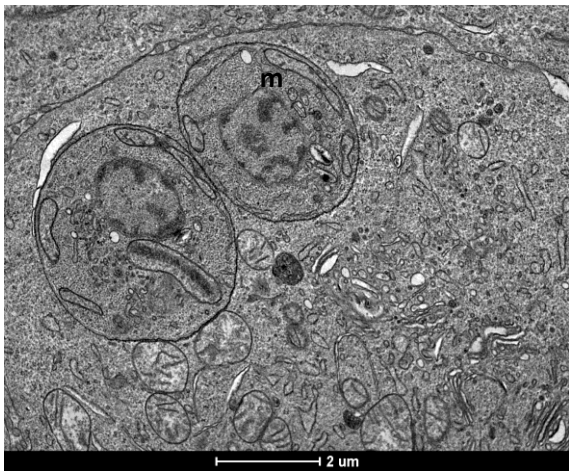
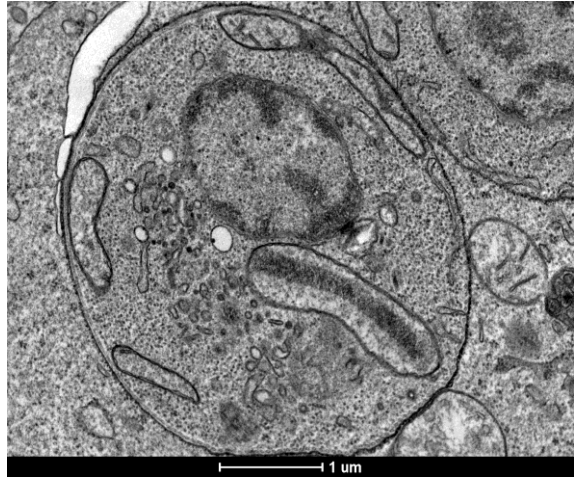
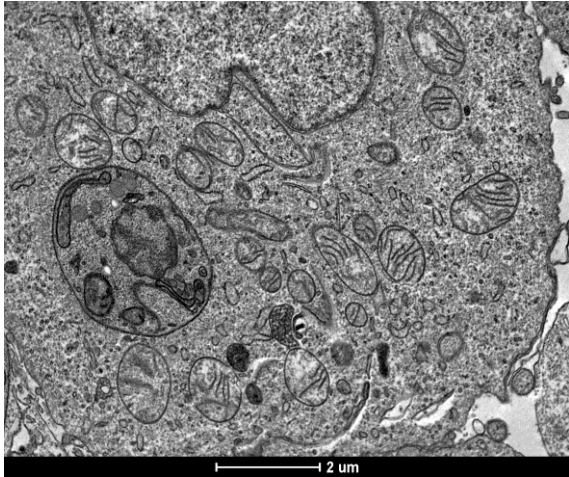
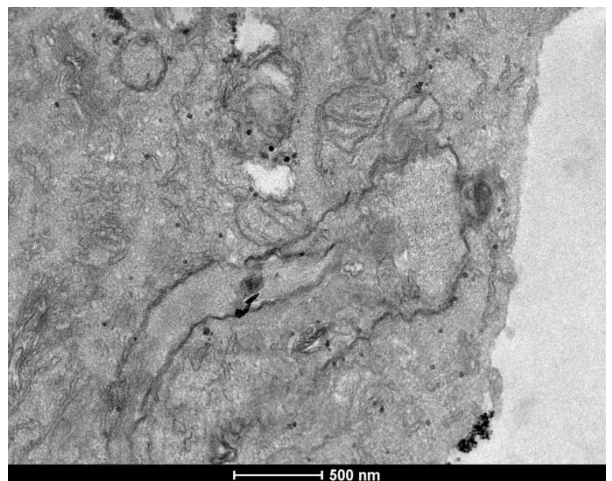
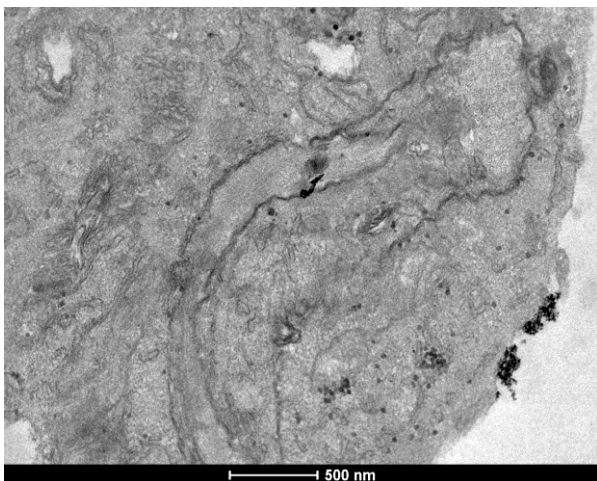
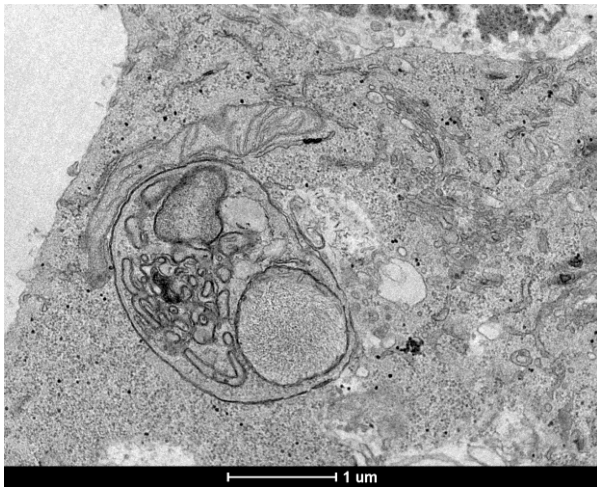
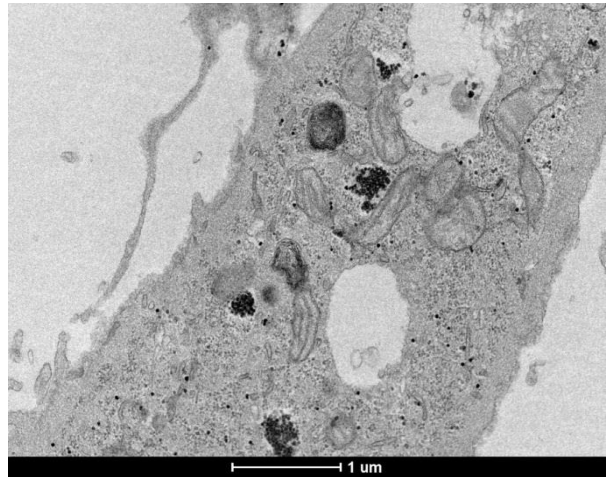
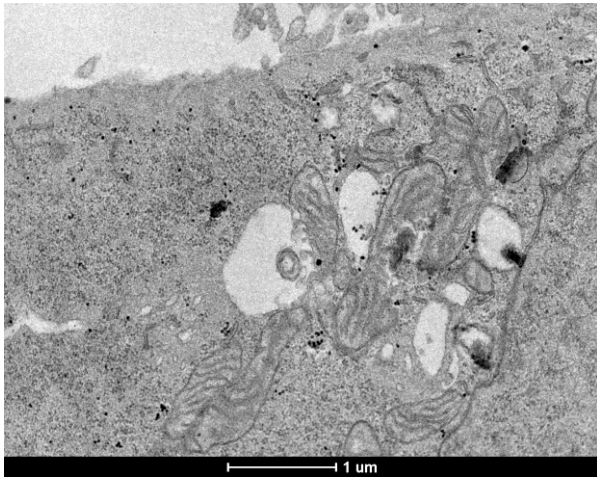


Figura 30. Imagens representativas de células LLC-MK2 processadas pela técnica *flat embedding* para observação em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12:

- (A) sem pré tratamento com TNF-alfa e sem infecção com *T. cruzi*
- (B) pré tratadas com TNF-alfa e sem infecção com *T. cruzi*.
- (C) sem pré tratamento com TNF-alfa e infectadas com o clone Col1.7G2
- (D) pré tratadas com TNF-alfa e infectadas com o clone Col1.7G2
- (E) sem tratamento com TNF-alfa e infectadas com o clone CL Brener.
- (**m**) representa mitocôndrias próximas à superfície do parasito.



6. Discussão e Conclusões

A investigação sobre o papel de citocinas sobre o fenômeno de invasão de células-alvo pelo *T. cruzi* é um tema relevante, uma vez que estudos tem demonstrado claramente a relação entre a persistência do parasito e a intensidade do processo inflamatório em lesões histopatológicas do tecido cardíaco e de órgãos digestivos, tanto em modelos experimentais como em humanos (Zhang e Tarleton, 1999; Palomino et al., 2000).

Em nosso trabalho avaliamos os efeitos do TNF-alfa sobre a invasão de células epiteliais pelos clones Col1.7G2 e CL-Brener de *T. cruzi* pertencentes, respectivamente, aos DTU TCI e TCVI.

O TNF é uma citocina pleiotrópica secretada principalmente por fagócitos mononucleares em resposta a estímulos relacionados a resposta imune ou a condições de estresse e tem papel central na regulação da inflamação. Quando secretada para o ambiente extracelular, essa citocina pode se ligar ao receptor TNFR1, com ativação do fator de transcrição NF-kB pela via clássica, ou ao receptor TNFR2 que ativa a via alternativa de NF-kB (Hatada et al., 2000; revisado em Wallach, 2015).

O NF-kB é um fator de transcrição pleiotrópico codificado por uma família de cinco genes principais, os quais contem domínios homólogos RDH (Rel homology domain) que incluem RelA (p65), RelB, Crel (REI), p50 e p52. Homodímeros ou heterodímeros de NF-kB permanecem inibidos no citoplasma quando ligado ao seu inibidor IκB. A fosforilação de IκB propicia a translocação de NF-kB para o núcleo e, portanto, a transcrição de genes relacionados a resposta inflamatória (revisado em Gambhir et al., 2015).

Hall et al. (2000) demonstraram que a ativação de NF-kB tem um papel direto na invasão de células epiteliais, endoteliais e fibroblastos por tripomastigotas de *T. cruzi*, uma vez que a inativação da sua via de sinalização pelo inibidor IκBaMA potencializa, de forma significativa, a invasão pelo parasito. Por outro lado, demonstrou que a interação de *T. cruzi* com células musculares cardíacas, lisas e esqueléticas induz a ativação de NF-kB, apesar da habilidade de essas células responderem a outros estímulos com a ativação desse fator de transcrição.

Em contraste com os resultados obtidos por Hall et al. (2000), *in vitro*, Penas et al. (2012) mostraram que a subunidade p65-NF-kB é detectada em extratos nucleares de tecido cardíaco no período de 48 horas após a infecção de camundongos com a cepa RA de *T. cruzi*. Esses mesmos autores também mostraram que a ativação do NF-kB no tecido cardíaco de

camundongos inoculados com a cepa K98 de *T. cruzi* se inicia somente após 11 dias de infecção.

Hovsepian et al. (2011) demonstraram que a prostaglandina 15dpGJ2 inibe a expressão e atividade de citocinas pro-inflamatórias - TNF-alfa e IL-10 - em cardiomiócitos infectados pelo *T. cruzi* e que esta inibição envolve cascatas de sinalização promovidas pelo NF-kB.

Pinto et al. (2011) mostraram que o tratamento de células epiteliais LLC-MK2 e HEK-293 com TNF previamente à infecção com *T. cruzi* facilita a invasão por tripomastigotas da cepa Y. Esses autores observaram que a proporção de células infectadas aumenta de 30% para cerca de 70% e o número de parasitas intracelulares dobra após tratamento com TNF. Essa ação do TNF é dependente de NF-kB. Ao contrário do encontrado por Pinto et al. (2011) com a cepa Y, nossos resultados mostram que o tratamento prévio de LLC-MK2 e HEK293 com TNF-alfa não altera a proporção de células infectadas com os clones Col1.7G2 e CL-Brener, assim como não altera o número de parasitos/100 células. França (2015) obteve resultados semelhantes aos encontrados em LLC-MK2 e HEK293 infectados pela cepa Y com cultivo primário de astrócitos. Nessas células, o tratamento com TNF-alfa prévio à infecção com a cepa Y resulta em maior proporção de células infectadas. Ao contrário, a infecção com o Col1. 7G2 não é alterada pelo TNF-alfa. Em nosso trabalho também mostramos que LLC-MK2 são mais susceptíveis a infecção com o clone Col1.7G2 quando comparada a infecção com clone CL-Brener, independentemente do tratamento com TNF-alfa. Cerca de 30% das células apresentam-se infectadas com esse clone após 22 horas de infecção. Proporção semelhante é obtida com a infecção pela cepa Y. No entanto, a proporção de células LLC-MK2 infectadas com o clone CL-Brener é bem menor, cerca de 12 a 15%, no mesmo período.

Esses dados parecem indicar que a ação do TNF-alfa sobre a invasão de células por tripomastigotas é dependente do tipo de população *T. cruzi*.

De modo interessante, a infecção de astrócitos com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* - na relação de 10 parasitos/célula - resulta em 70- 90% de células infectadas, ou seja, cerca de 2,5 a 3 vezes maior que a proporção de células LLC-MK2 e HEK293 infectadas por essa cepa (França, 2015). Esses dados sugerem uma maior susceptibilidade de astrócitos à infecção pela cepa Y de *T. cruzi* quando comparada a infecção de células epiteliais. Essa susceptibilidade de astrócitos continua evidente mesmo quando a infecção é feita na proporção de 2 parasitos/célula, quando se obtém 40- 50% de células infectadas pela cepa Y e 30- 40% pelo clone Col1.7G2.

Por outro lado, Silva et al. (2015) mostraram que astrócitos submetidos ao tratamento com IFN-gamma são mais susceptíveis a infecção e multiplicação do clone Col1.7G2. Por sua vez, células de linhagem fibroblástica submetidas às mesmas condições não se tornam mais susceptíveis à invasão por esse clone.

Esses resultados mostram a pertinência de estudos mais aprofundados sobre os efeitos de citocinas sobre a invasão de células-alvo por *T. cruzi*.

Recentemente, Magalhaes et al. (2015) mostraram que monócitos isolados de humanos e infectados com o clone Col1.7G2 exibem um aumento significativo na expressão de CD80 e CD86 e na produção de IL-10, quando comparados com monócitos infectados com a cepa Y. A infecção com o clone Col1.7G2 também leva a um aumento na expressão de IL-17 por células T CD8+ e, interessantemente, apenas após a infecção com a cepa Y é possível observar uma correlação entre a expressão de TNF-alfa e granzima A nessas células.

Esses dados demonstram que o clone Col1.7G2 tem maior capacidade de ativar monócitos que a cepa Y e que populações de *T. cruzi* TCI e TCII podem ter distintos impactos imunológicos em células humanas durante fases iniciais da infecção influenciando a progressão da doença.

Roggero et al. (2002) sugeriram que a susceptibilidade diferencial na infecção aguda pelo *T. cruzi* estaria correlacionada a um desequilíbrio no perfil de citocinas circulantes como TNF-alfa, IL-10 e IL-1, assim como outros compostos relacionados, que embora seja essencial para a resistência do hospedeiro, também podem contribuir para alterações patológicas, muitas vezes não correlacionada com a carga parasitária.

Interessante ressaltar que alguns estudos tem indicado que tGPIs presentes na superfície de cepas Colombiana, Y e CL induzem produção diferenciada de NO e citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e IL-12 (Soares et al., 2012; Almeida et al. 2000).

Nogueira et al. (2015) sugerem que o polimorfismo das vesículas extracelulares de diferentes populações de *T. cruzi* são capazes de determinar eventos imunopatológicos nos tempos iniciais de infecção e na fase aguda da doença. A composição dessas vesículas poderia, de acordo com esses autores, explicar diferenças na virulência das populações. Esses autores exemplificam com a cepa Colombiana, extremamente virulenta em camundongos, cujas vesículas possuem menos epitopos alfa-Gal e seriam menos suscetível a ação lítica de anticorpos (Almeida et al. 2000). Nogueira et al. (2015) mostraram que vesículas de diferentes populações podem ativar MAPKs via TLR2 (cepas CL 14 e YuYu) ou via internalização e posterior ativação de MAPKs (cepas Colombiana e Y). Essa capacidade

distinta de ativar MAPKs reforça uma importante variação nos eventos iniciais da resposta imune por diferentes populações de *T.cruzi*

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que as populações Col1.7G2 e CL Brener causam diferentes alterações histopatológicas em modelo animal. Ratos jovens infectados pelo clone CL-Brener, bem como as populações ABC e Y, apresentaram miocardite severa com resolução logo após o fim da fase aguda da doença. O clone Col1.7G2 induz uma longa fase aguda com baixa parasitemia, baixa mortalidade e miocardite de intensidade média com manutenção do processo inflamatório devido a persistente proliferação de amastigotas (Camargos et al., 2000). Esses autores também mostraram que o grau de desnervação simpática do coração na fase aguda é variável de acordo com a população de *T. cruzi*. O clone CL Brener causa desnervação simpática acentuada. Já a infecção com o clone Col1.7G2 resulta em discreta desnervação cardíaca.

Há dados na literatura que mostram diferença na susceptibilidade do hospedeiro em modelos experimentais. Camundongos C57BL são mais resistentes a cepa Colombiana (Andrade et al., 1985) e mais susceptíveis a infecção pela cepa Tulahuen, quando comparados a camundongos BALB/c, que por sua vez são mais susceptíveis a cepa Peru (Wrightsmann et al. 1982), porém quando inoculados com Peruvian, ambos modelos animais apresentam similar susceptibilidade (Andrade, et al 1985).

Em relação aos nossos resultados obtidos com microscopia eletrônica de transmissão, destacamos a possibilidade de o tratamento com TNF-alfa induzir maior frequência de projeções citoplasmáticas em LLC-MK2 infectadas com o clone CL Brener ou Col1.7G2. Melo et al (2002) demonstraram que nos tempos iniciais de infecção, o *T. cruzi* induz a formação de corpos lipídicos em macrófagos e que este aumento pode estar correlacionado com o aumento na produção de prostaglandinas por estas células. Essas organelas estão notoriamente envolvidas na resposta do hospedeiro durante a infecção aguda *in vivo*, sendo, portanto, um mediador estrutural da resposta imune inata em células fagocíticas (Melo et al., 2006). Em nosso trabalho foi observado a presença de corpos lipídicos.

Outro achado de nosso estudo refere-se a uma nítida aproximação de mitocôndrias com a superfície do parasito, tanto em na infecção com o clone CL-Brener quanto com o clone Col.17G2, sugerindo algum tipo de envolvimento dessa organela com o parasito intracelular. Não encontramos descrição desse tipo de interação na literatura investigada,

Báez et al. (2008, 2011, 2012), estudaram, em camundongos infectados por populações distintas de *T. cruzi* - Tulahuen e SGOZ12 -, as alterações estruturais e funcionais

de mitocôndrias nos estágios agudo, indeterminado e crônico da infecção. A infecção induz alterações mitocondriais como aumento de matriz e desorganização das cristas. Alterações funcionais também puderam ser observadas em todos os grupos analisados de forma similar, como por exemplo, a atividade citrato sintase e dos complexos I a IV. Esses dados demonstram que as alterações estruturais e funcionais de mitocôndrias do tecido cardíaco de camundongos infectados são dependentes da população de *T. cruzi* e do estágio evolutivo da doença.

Nosso trabalho não mostrou qualquer alteração degenerativa nas mitocôndrias de LLC-MK2, no período de até 22 horas de infecção com os clones Col1.7G2 ou CL-Brener. Avaliamos ser necessária a análise ultraestrutural em períodos mais longos de infecção nessas células, de modo a revelar a sequência de interação mitocondrial com o parasita ou mesmo a ocorrência de alguma alteração degenerativa.

Nossos resultados permitem concluir que:

- i) O tratamento de células epiteliais LLC-Mk2 e HEK293 com TNF-alfa não facilita a invasão de tripomastigotas do clone Col1.7G2 ou do clone CL-Brener;
- ii) a infecção de células HEK-293 com o clone CL-Brener resulta em apenas 12-15% de células infectadas no período de 22 horas;
- iii) a infecção de células LLC-MK2 e HEK293 com o clone Col1.7G2 resulta em cerca de 30% de células infectadas no período de 22 horas;
- iv) no período de infecção analisado, há uma interação de mitocôndrias de células LLC-MK2 com as formas intracelulares de *T. cruzi*.

7. Referências

- ALMEIDA-DE-FARIA, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote-like form. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 92, n. 4, p. 263-274, Ago. 1999.
- ALMEIDA, I. C. et al. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **The EMBO Journal**. v. 19, n. 7, p. 1476-1485, Abr. 2000. doi: 10.1093/emboj/19.7.1476
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 200, n. 9, p. 1135-1143, Nov. 2004.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews. Microbiology**, London, p. 1-5, Sept. 2005. DOI:10.1038/nrmicro1249
- ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 17-27, jan./mar. 1990.
- ANDRADE, S. G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETTO, M. (Ed.). ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 177-200.
- ANDRADE, V. BARRAL-NETTO, M. ANDRADE S.G. Patters of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are deterined by parasite strain. **Braz J Med Biiol Res**, v. 4 n. 18, p. 499-506. 1985.
- BÁEZ, A. L. et al. Chronic indeterminate phase of Chagas' disease: mitochondrial involvement in infection with two strains. **Parasitology**, v. 140, p. 414–421, Dec. 2012. doi:10.1017/S0031182012001771.
- BÁEZ, A. L. et al. Mitochondrial involvement in chronic chagasic cardiomyopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 105, p. 239-246, 2011.
- BÁEZ, A. L. et al. *Trypanosoma cruzi*: cardiac mitochondrial alterations produced by different strains in the acute phase of the infection. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 120, p. 397-402, 2008.

BARRIAS, E. S.; CARVALHO, T. M. U. de; SOUZA, W. de. *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in Immunology**, Rockville, v. 4, n. 186, p. 1-10, Aug. 2013.

BARRIAS, E. S. et al. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 363, n. 3, p. 828-834, Sept. 2007.

BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of Chronic Chagas' Disease. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 205-213, Nov. 1987.

BRUTUS, L. et al. Short report: detectable *trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Mclean, v. 83, n. 5, p. 1044-1047, 2010.

CAMARGOS, E. R. S. Infection with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Mclean, v. 62, n. 5, p. 604-612, 2000.

CAMPOS, M.A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **The Journal of Immunology**, Rockville, v.167, n. 1, p. 416-423, Jul. 2001.

CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Current Molecular Medicine**, Omaha, v. 4, n. 6, p. 549-562, 2004.

COURA, J.R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vetors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.110, n.3, p. 277-282, May. 2015.

COVARRUBIAS, C. et al. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 14, p. 1609-1616, Dec. 2007.

DIAS, J. C. P. Acute Chagas' disease. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 85-91, 1984. Supplement.

DIAS, J. C. P. The treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis). **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 144, n. 10, p. 772-774, May 2006.

- DVORAK, J. A.; HYDE, T. P. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 34, p. 268-283, 1973.
- FERNANDES, A. B.; MORTARA, R. A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by *Trypanosoma cruzi* amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, p. 460-467, Jan. 2004.
- FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 36, p.734-747, 2012.
- FERNANDES, M. C. et al. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. **International Journal for Parasitology**, Oxford, 37, n. 13, p. 1431-1441, 2007.
- FERNANDES, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 208, p. 909-921, 2011.
- FRANCO, D. J. et al. *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 104, p. 54-61, June 2003.
- GAMBHIR, S. et. al. Nuclear factor kappa B role in inflammation associated gastrointestinal malignancies. **World Journal Gastroenterology**.2015 March 21; v. 21, n. 11, p. 3174-3183, Mar.2015.
- GARRIDO, V. V. et.al. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. **International Journal of Biological Sciences**, Macau, v. 7, n. 9, p. 1257-1272, Oct. 2011.
- GERAIX, J. et al. Clinical and nutritional profile of individuals with Chagas disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 4, p. 411-414, Aug. 2007.
- GRAVINA, H. D. et al. differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 5, May 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0063100
- HALL, B. S. Cell-specific Activation of Nuclear Factor- κ B by the Parasite *Trypanosoma cruzi* Promotes Resistance to Intracellular Infection. **Molecular Biology of the Cell**. v.12, p. 153-160, Jan. 2000.

HARDISON, J. L. et al. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.1, p.135-143, Jan. 2006.

Hatada, E.N., Krappmann, D., Scheidereit, C. NF-kappaB and the innate immune response. **Current Opinion Immunology**. v. 12, p. 52–58, Fev. 2000.

HOVSEPIAN, E. et al. Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy-D^{12,14} prostaglandin J2 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. **International Journal for Parasitology**, Oxford. v. 41, p.553–562, Jan. 2011.

HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R.; PIRAS, M. M. The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 2, n. 5/6, p. 359-366, Apr. 1981.

HISSA, B.; ANDRADE, L. de O. *Trypanosoma cruzi* uses a specific subset of host cell lysosomes for cell invasion. **Parasitology International**, Tokyo, v. 64, p. 135-138, Nov. 2014.

HISSA, B. et al. Membrane cholesterol regulates lysosome- plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of hostcells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. e1583, 2012.

HOTEZ, P. J. et al. Chagas Disease: “The New HIV/AIDS of the Americas”. **PLoS Neglected Tropical Disease**. San Francisco, v. 6, n. 5, p. e1498.

HUANG, H. et al. Activation of Transcription Factors AP-1 and NF- κ B in Murine Chagasic Myocarditis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2859-2867, May 2003.

IANNI, B. M. et al. Chagas' heart disease: evolutive evaluation of electrocardiographic and echocardiographic parameters in patients with the indeterminate form. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 59-62, 2001.

LAGES-SILVA, E. et al. Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 34, n.1, p. 118-123, Nov. 2002.

LAZO, J. et al. Chagasic meningoencephalitis in the immunodeficient. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, 56, n. 1, p. 93-97, 1998.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 4, p. 342-348, Apr. 2013. DOI:10.1016/S1473-3099(13)70002-1.

MACHADO, F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. **Circulation**, Dallas, v. 102, p. 3003-3008, Dec. 2000.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. 1-17, July 2015. DOI:10.1371/journal.pntd.0003816.

MAGDESIAN, M. H. et al. **Infection by Trypanosoma cruzi**. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *Journal of Biological Chemistry*, Washington DC, v.276, n.22, p. 19382-19389, Jun. 2001.

MARTELLO, L. A. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* infectivity, proliferation, and cytokine patterns in gut and pancreatic epithelial cells maintained in vitro. **Parasitology Research**, Berlin, v. 112, p. 4177-4183, 2013. DOI:10.1007/s00436-013-3609-7.

MARTINS, K. et al. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in the semiarid region of Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, p. 1-24, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.08.012>

MATA, J. R. da et al. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 53, n. 2, p.153-162, Sept. 2000. DOI: 10.1016/S0361-9230(00)00326-9.

MATTEONI, R. & KREIS, T. E. Translocation and Clustering of Endosomes and Lysosomes Depends on Microbules. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 105, p. 1253-1265, Sept. 1987.

MELO, R. C. N. et al. Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflammation Research**, Basel, v. 55 p. 342-348, Mar. 2006.

MELO, R. C. N. et al. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. **Tissue and Cell**, Essex, v. 35, p. 59-67, 2003.

MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of Hela Cells. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 73, p. 1-14, 1991.

MUKHERJEE, S. et al. *Trypanosoma cruzi* invasion is associated with trogocytosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 17, p. 62-70, 2015.

NAGIB, P. R. A. et al. *Trypanosoma cruzi*: populations bearing opposite virulence

induce differential expansion of circulating CD3+CD4⁻CD8⁺ T cells and cytokine serum levels in young and adult rats. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 116, p. 366-374, 2007.

NÓBREGA, A. A. et al. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, n. 4, p. 653-655, Apr. 2009.

NOGUEIRA, N. Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Ciba Foundation Symposium**, Amsterdam, v. 99, p. 52-73, 1983.

NOGUEIRA, P. M. et al. Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. **Journal of Extracellular Vesicles**, v.4, Nov. 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.28734.

OZINSKY, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC, v. 97, n. 25, p. 13766-13771, Dec. 2000.

PALOMINO, S. A.; AIELLI, V. D.; HIGUCHI, M.L. Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 94, n.6, p. 571-579, Sep. 2000.

PENAS, et. al. PPAR γ ligand treatment inhibits cardiac inflammatory mediators induced by infection with different lethality strains of *Trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1832, p. 239–248. Aug, 2012.

PEREIRA, M. E. A. et al. Invasive phenotype of *Trypanosoma cruzi* restricted to a population expressing *trans*-Sialidase. **Infection and Immunity**, Washington, v. 64, n. 9, p. 3884-3892, Sept. 1996.

PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, London, v. 19, p. S10-S11, June 2010.

PINTO, A. M. T. et al. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF- κ B activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Microbiology**, Oxford, p. 1-12, 2011. DOI:10.1111/j.1462-5822.2011.01636.x

PREVIATO, J. O. et al. Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 16, p. 85-96, 1985.

RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr. 2010.

REZENDE-OLIVEIRA, K. SARMENTO, R. R. RODRIGUES, V.Jr. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.45, n. 1, p.45-50, Feb. 2012.

RODRIGUES, C. M. et al. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **Neglected Tropical Diseases**, Switzerland, v. 4, n. 10, p. 1-15, Oct. 2010. DOI:10.1371/journal.pntd.0000846

RODRIGUEZ, A. et al. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 129, n. 5, p. 1263-1273, June 1995.

ROGERRO, E. et al. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clinical Experimental Immunology**. V. 128, n. 3, p. 421-428, Jun. 2002.

ROPERT, C. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **The Journal of Immunology, Rockville**, v.166, n. 5, p.3 423-3431, Mar. 2001.

RUIZ, R. C. et al. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. **The Biochemical Journal**, London, v. 330, p. 505-511, 1998.

SCHENKMAN, S.; EICHINGER, D. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 9, p. 218-222, 1993.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, Basel, v. 115, n. 1/2, p. 14-21, 2010.

SILVA, R. R. et al. Interferon-gamma promotes infection of astrocytes by *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. 1-23, Feb. 2015.
DOI:10.1371/journal.pone.0118600

SOARES, R. P. et al. Intraspecies Variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-Mucins: Biological Activities and Differential Expression of α -Galactosyl Residues. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Mclean, v. 87, n. 1, p. 87-96, 2012.

SOUSA, G. R. et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-9, Mar. 2014.
DOI:10.1371/journal.pone.0087082.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, Sept. 2004.

SOUZA, W. de. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology**, New York, v. 86, p. 197-283, 1984.

TAFURI, W. L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Mclean, v. 19, n. 3, p. 405-417, May 1970.

TANOWITZ, H. B. et al. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 166, n. 3, p. 598-603, 1992.

TARDIEUX, I. P. et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, Riveport, v. 71, p. 1117-1130, Dec. 1992.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. **The Journal of Clinical Investigation**, Durham, v. 62, p. 1132-1141, Dec. 1978.

VÁZQUEZ, A. et al. Mouse Macrophage Galactose-type Lectin (mMGL) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. **International Journal of Biological Sciences**, Macau, v. 10, n. 8, p. 909-920, 2014. DOI: 10.7150/ijbs.9214

VÁZQUEZ, B. P. et al. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, n. 206, p. 1-12, 2015.

WALLACH, D. The cybernetics of TNF: Old views and newer ones. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Oct. 2015. DOI: t

WEINKAUF, C. SALVADOR, R. PEREIRAPERRIN, M. Neurotrophin receptor TrkC is an entry receptor for *Trypanosoma cruzi* in neural, glial, and epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 79, n. 10, p. 4081-4087, Oct. 2011.

WRIGHTSMAN, R. KRASSNER, S. WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. **Infection and Immunity**, Washington, v.36, n.2, p.637-644, May. 1982.

WOOLSEY, A. M. et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. **Journal of Cell Science**, London, v. 116, p. 3611-3622, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 180, p. 480-486, Aug. 1999.

ZINGALES, B. et AL. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, Nov. 2009.

ZINGALES, B. et al. Correlation of tunicamycin-sensitive surface glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* with parasite interiorization into mammalian cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, p. 21-34, 1985.