

REINALDO ÁTILA FRANÇA CORDEIRO

**EFEITOS DO TNF- α SOBRE A INFECÇÃO DE CÉLULAS DA GLIA
COM *TRYPANOSOMA CRUZI***

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2015

REINALDO ÁTILA FRANÇA CORDEIRO

EFEITOS DO TNF- α SOBRE A INFECÇÃO DE CÉLULAS DA GLIA
COM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Elizabeth
Ribeiro da Silva

Co-orientadora: Dra. Vanessa Cabreira
de Freitas

Universidade Federal De Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

2015

Dissertação realizada no laboratório Prof.^a Conceição Machado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação da Prof.^a Dra. Elizabeth Ribeiro da Silva e co-orientação da Dra. Vanessa Cabreira de Freitas, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças para continuar a caminhada.

À toda minha família, em especial aos meus irmãos, Jack, que iniciou comigo essa caminhada, durante a graduação, Si, Kenya e Jonathan, cunhados, sobrinhos, à Dani e à Laurinha e aos meus pais, Maria e João, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos. Muito obrigado pelo carinho, amor, paciência e principalmente por acreditar em mim. Amo vocês!

À prof^a. Dr^a. Elizabeth Ribeiro da Silva por ter aceitado ser minha orientadora. Muito obrigado pela oportunidade e trabalho confiado.

À Dr^a. Vanessa Freitas pela co-orientação nesse trabalho.

À prof^a. Dr^a. Patrícia por todo apoio dado à realização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Antônio Carlos P. de Oliveira pela grande ajuda, disponibilidade e atenção que sempre demonstrou durante os ensinamentos do isolamento de astrócitos e micróglias.

À prof^a. Dr^a. Luciana de Andrade pela doação de anticorpo utilizado no projeto.

Às prof^{as}. Dr^{as}. Camila Megale, Paula Scalzo, Leonor Guerra, Débora Dávila.

Ao prof. Dr. Egler Chiari e ao técnico Afonso pela doação dos parasitos.

Aos grandes professores da minha graduação que me ensinaram os primeiros passos na trajetória da Ciência.

À prof^a. Dr^a. Mônica Vianna por quem tenho enorme admiração e carinho por ter-me aberto às portas da neurociência.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, servindo como exemplo e que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À todos os colegas e amigos de laboratório, em especial à Maísa, que participou de todo o projeto, ao Renan, à Grazi, à Bruna, à Patrícia, pelo auxílio prestado, pelos momentos de aprendizado, pela descontração, força e amizade. Muito obrigado.

A todos os meus amigos, em especial, Nati, Fran, Angélica, Lídia, Jonas, Gleice, pela compreensão e apoio durante todo o tempo. Obrigado por tudo! A amizade e apoio de vocês foi fundamental. Tenho certeza que não foi por acaso que o destino fez que nos conhecêssemos, e até mesmo a distância que enfrentamos nos une cada vez mais e tenho certeza que nossa amizade vai perdurar pela eternidade!!!

E a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para essa construção.

À CAPES pelo financiamento da minha bolsa e ao CNPQ e FAPEMIG pela concessão de todo financiamento do projeto juntamente com a CAPES.

Finalmente, volto a agradecer a toda minha família e aqueles amigos que se tornaram também minha família, vocês com certeza são as pessoas mais especiais em minha vida. Desculpem pela ausência, mas saibam que cada segundo que estive longe nunca deixei de pensar e me preocupar com vocês.

LISTA DE ABREVIATURAS

AraC	Arabnoside cytosine
BK	Bradykinin
BHE	Barreira hematoencefálica
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTUs	Discrete Typing Units
ECM	Extracellular matrix
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GFAP	Glial fibrilar cidic protein
HEK293T	Human embrionic kidney
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IBA-1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
I-CAM	Cellular adhesion molecule 1
IFN- γ	Interferon gamma
IHA	Indirect hemmaglutination assay
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-18	Interleukin 18

IP3	Inositol triphosphate
NK	Natural killer
NO	Nitric oxide
OPS/OMS	Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate buffered saline
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PLC	Phospholipase C
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TcI-TcVI	<i>T. cruzi</i> I- VI
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Síntese de moléculas envolvidas na interação do <i>T. cruzi</i> com o hospedeiro vertebrado.....	8
---	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul.....	7
Figura 2. Moléculas envolvidas na interação entre célula hospedeira e <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 3. Ilustração de um vaso capilar pós cerebral mostrando a BHE.....	12
Figura 4. Cultura primária de astrócitos. Imunofluorescência com anti-GFAP para marcação de astrócitos.....	21
Figura 5. Cultura primária de micróglia. Imunofluorescência com anti-IBA1 para marcação de micróglia.....	23
Figura 6. Cultura primária de astrócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> na proporção de 10 parasitos/célula.....	25
Figura 7. Infecção de astrócitos por tripomastigotas da cepa Y de <i>T. cruzi</i> nas proporções de 2:1, 5:1 e 10:1 parasitos por célula.....	27
Figura 8. Imagem representativa de astrócitos infectados com cepa Y de <i>T. cruzi</i> nas proporções 2:1, 5:1 e 10:1 parasitos por célula.....	28
Figura 9. Percentagem de astrócitos infectados pelas cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α	30
Figura 10. Número de parasitos intracelulares em astrócitos infectados pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α	31
Figura 11. Percentagem de micróglia infectadas pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α . A.....	32
Figura 12. Número de parasitos intracelulares em micróglia infectada pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α	33
Figura 13. Efeito do tratamento com 20ng de TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de astrócitos pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i>	34
Figura 14. Efeito do tratamento com TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de astrócitos pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> no tempo de 2 horas.....	35
Figura 15. Efeito do tratamento de TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de astrócitos pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> no tempo de 24 horas.....	37
Figura 16. Efeito do tratamento com 20ng de TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de micróglia pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 17. Efeito do tratamento de TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de micróglia pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> no tempo de 2 horas.....	40
Figura 18. Efeito do tratamento de TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de micróglia pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i> no tempo de 24 horas.....	42

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, representa um grave problema de saúde pública na América Latina. Logo no início da infecção, o *T. cruzi* induz uma intensa resposta inflamatória, com maior produção de IL-12 e TNF- α por células dendríticas/macrófagos e de IFN- γ por células natural killer (NK). Essa resposta desempenha um papel crucial na patogênese da doença. Em pacientes com idade inferior a dois anos e em adultos imunossuprimidos, o *T. cruzi* pode causar danos ao SNC. A proliferação de astrócitos e de micróglia é uma reação comum a danos no SNC. O fato de TNF- α aumentar a susceptibilidade de células epiteliais à infecção pelo *T. cruzi* parece indicar que a interação do parasito com a célula hospedeira depende de inúmeros fatores, dentre eles o microambiente em que ela está inserida. Desse modo, torna-se relevante avaliar os efeitos do TNF- α sobre invasão de astrócitos e micróglias. Neste trabalho, ambas as células foram isoladas de cérebros de ratos e foram infectadas pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*, 6 horas após o tratamento com 20ng/ml de TNF- α . Astrócitos tratados com TNF- α apresentaram aumento significativo da porcentagem de células infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*, 2 e 24 horas após a infecção, em comparação aos astrócitos não tratados. Essas células também apresentaram aumento significativo no número de parasitos/100 células 2 horas após a infecção. Por sua vez, astrócitos infectados com o clone Col 1.7G2 não apresentaram diferença nesses parâmetros após tratamento com TNF- α . Micróglia tratada com 20ng/ml de TNF- α , 6 horas antes da infecção com cepa Y de *T. cruzi*, apresentaram aumento significativo da proporção de células infectadas em relação às células não tratadas. Por sua vez, a infecção dessas células com o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* não resultou em alteração nesses parâmetros após o tratamento com TNF- α . Nossos resultados indicam que o TNF- α age de modo distinto sobre a infecção de astrócitos e micróglia. Nossos resultados também mostram que populações distintas de *T. cruzi* podem utilizar mecanismos diferentes para invasão da célula-alvo.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* protozoan parasite, is a serious public health problem in Latin America. Early in infection, *T. cruzi* induces an intense inflammatory response that involves increased IL-12 and TNF- α production by dendritic cells and macrophages, and IFN- γ by natural killer (NK) cells. This response plays a crucial role in the pathogenesis of the disease. In patients under the age of two years and in immunosuppressed adults, *T. cruzi* can cause damage to the CNS. The proliferation of astrocytes and microglia is a common response to injury in the CNS. The fact that TNF- α increases the susceptibility of epithelial cells to infection with *T. cruzi* seems to indicate that the interaction of the parasite with the host cell depends on numerous factors, including the microenvironment in which it is inserted. Thus, it becomes important to evaluate the effects of TNF- α on astrocyte and microglia invasion. Both cells were isolated from rat brains and were infected with the strain Y or the clone Col1.7G2 6 hours after treatment with 20 ng/ml of TNF- α . Astrocytes treated with TNF- α showed a significant increase in the percentage of cells infected with *T. cruzi* Y strain, 2 and 24 hours after infection, in comparison to untreated astrocytes. These cells also showed a significant increase in the number of parasites /100 cells 2 hours after infection. In turn, Col1.7G2-infected astrocytes showed no differences in these parameters after treatment with TNF- α . Microglia treated with 20ng / ml TNF- α for 6 hours prior to infection with *T. cruzi* Y strain showed a significant increase in the proportion of infected cells compared to untreated ones. On the other hand, infection of these cells with the *T. cruzi* Col1.7G2 clone resulted in no differences in these parameters after treatment with TNF- α . Our results indicate that TNF- α acts differently on astrocytes and microglia infection with *T. cruzi*. Our results also show that different *T. cruzi* populations might interact in a different way with the target cell.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	v
Lista de quadros.....	vi
Lista de figuras.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução e justificativa	3
1.1. Doença de Chagas	3
1.2. Aspectos da interação do <i>Trypanosoma cruzi</i> com o hospedeiro vertebrado	6
1.3. Células da glia	11
1.4. Barreira hematoencefálica	12
1.5. TNF- α	13
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivos específicos.....	14
3. Metodologia	15
3.1. Cultivo celular	15
3.1.1. Isolamento de astrócitos e micróglia	15
3.1.2. Manutenção da cepa Y	16
3.1.3. Manutenção do clone Col 1.7G2.....	16
3.2. Padronização do Ensaio: Quantificação de parasitos em infecção de astrócitos pela cepa Y de <i>T. cruzi</i>	17
3.3. Padronização do Ensaio: Tratamento com TNF e infecção de astrócitos e micróglia com a cepa Y e com o clone Col 1.7G2 de <i>T. cruzi</i>	17
3.4. Determinação do percentual de células infectadas e da taxa de infecção	18
3.5. Imunocitoquímica em microscopia de fluorescência.....	18
3.6. Análise estatística	20
4. Resultados.....	21
4.1. Cultivo celular	21

4.1.1. Cultura primária de astrócitos	21
4.1.2. Cultura primária de micróglia	22
4.2. Infecção de astrócitos e micróglia com <i>T. cruzi</i>	24
4.3. Determinação da concentração de TNF-alfa a ser utilizada na infecção de astrócitos com a cepa Y e o clone Col 1.7G2	29
4.4. Determinação da concentração de TNF-alfa a ser utilizada na infecção de micróglia com a cepa Y e o clone Col 1.7G2	31
4.5. Efeito do tratamento com 20ng de TNF-alfa sobre a infecção de astrócitos com a cepa Y e o clone Col 1.7G2	33
4.6. Efeito do tratamento com 20ng de TNF-alfa sobre a infecção de micróglia com a cepa Y e o clone Col 1.7G2	39
5. Discussão	44
6. Conclusões	48
7. Referências	49

1. Introdução e justificativa

1.1. Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, descrita por Carlos Chagas em 1909, é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*.

A doença de Chagas continua representando um grave problema de saúde pública na América Latina, onde estima-se que cerca de 6-7 milhões de pessoas estejam infectadas e 25 milhões em risco de adquirir a doença (WHO, 2014). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, predominam os casos crônicos da doença decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente 3 milhões de indivíduos infectados (Ministério da Saúde, 2014). Embora seja endêmica na América Latina, a doença de Chagas evoluiu para um problema global de saúde devido à migração dos infectados para outros continentes, principalmente Europa e Oceania (Schmunis & Yadon, 2010).

Distinguem-se duas fases clínicas durante o curso da doença, uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda, período em que o parasito pode ser facilmente encontrado no sangue de pacientes, inicia-se após um período de incubação de 7 a 14 dias e manifesta-se por mal-estar geral, febre, sudorese abundante, dores musculares, irritação, anorexia e, às vezes, vômitos e diarreias. Sinais locais na porta de entrada do parasito, como edema periorbital indolor (sinal de Romana) e conjutivite, assim como linfonodomegalias, edema generalizado, hepatomegalia, e, ocasionalmente, erupções cutâneas, são descritos nessa fase (Prata, 2001). Há descrição de sintomas e sinais de envolvimento cardíaco, e em alguns casos, sintomas e sinais de envolvimento do sistema nervoso central (SNC), como meningoencefalite aguda (Laranja, Dias *et al.*, 1956). A maioria dos pacientes recupera-se em 3 a 4 meses. Em necropsias de pacientes falecidos na fase aguda são observadas as formas amastigotas do parasito em células do músculo cardíaco, esquelético e liso, bem como em células da glia (Tanowitz, Kirchhoff *et al.*, 1992).

Durante a fase crônica, o parasito é raramente detectado no sangue periférico e o diagnóstico baseia-se na presença de anticorpos específicos contra antígenos do parasito (Rodrigues, dos Reis *et al.*, 2012). A maioria dos pacientes passa para a forma indeterminada da fase crônica, com duração de 10 a 30 anos ou toda a vida, no qual os

indivíduos não apresentam sinais clínicos característicos de comprometimento cardíaco ou digestivo evidenciados por eletrocardiograma e exames cardiológicos do coração, esôfago e cólon (Prata, 2001).

Dentre as formas clínicas sintomáticas, a cardiopatia chagásica crônica é a forma de maior ocorrência no Brasil, acometendo cerca de 20 a 30% dos pacientes (Andrade, 1991). Eletrocardiogramas obtidos em áreas endêmicas tem mostrado que cerca de 2% dos pacientes progridem da forma indeterminada para a forma cardíaca a cada ano, onde a característica principal é a alta frequência de arritmias, com diminuição da espessura e déficit preferencialmente localizados na ponta do ventrículo esquerdo, podendo levar à morte súbita por insuficiência cardíaca congestiva. Em uma área endêmica, 15-20% dos pacientes chagásicos desenvolvem alterações da motilidade, secreção e absorção no trato digestivo, especialmente o esôfago e o cólon (Prata, 2001).

Pacientes crônicos que se tornam imunodeprimidos podem apresentar reativação da doença, uma condição caracterizada pelo aumento da parasitemia e apresentações atípicas como lesões epidérmicas e comprometimento do SNC (Pittella, 1993; Prata, 2001; Lages-Silva, Ramirez *et al.*, 2002; Andrade, Main-Neto *et al.*, 2011).

As formas clássicas de transmissão da doença de Chagas incluem a via vetorial e via transfusional. Em áreas endêmicas, a principal via de transmissão é a vetorial. Os vetores do *T. cruzi* são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (WHO, 2002). Os triatomíneos eliminam os parasitas em suas fezes durante a hematofagia e os hospedeiros vertebrados se infectam quando tripomastigotas alcançam regiões de mucosa ou de descontinuidade de epitélio deixada pelo ato de coçar (Dias, 1956). Transmissão oral, transmissão vertical ou congênita, acidental e por transplantes de órgãos, são consideradas vias alternativas. Modos pouco frequentes ou excepcionais incluem a transmissão por via sexual, por contaminação por meio de outros vetores e por outras práticas (Dias & Macedo, 2005; Dias, Neto & Luna, 2011).

A eficácia de estratégias de controle da transmissão vetorial é heterogênea na América Latina. A iniciativa começou em 1991, com Brasil, Argentina, Chile, Paraguai e Uruguai; em 1997, com Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela (nos três últimos a situação ainda é grave devido ao menor número de atividades de vigilância e controle); em 1998, com países da América Central e do México. A eliminação dos vetores requer um controle contínuo e ações de vigilância epidemiológicas (Coura,

2013). Nos últimos anos, observa-se uma intensa e consistente redução na transmissão da doença de Chagas, com controle regular do vetor e bancos de sangue (Dias, 1957; Dias, 2009). Vale ressaltar que em 2006 o Brasil recebeu uma certificação concedida pela OPS/OMS (Organização Panamericana de Saúde/Organização Mundial de Saúde) relativa à eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo principal vetor, *Triatoma infestans*, e pela via transfusional (Dias, 2006; Silveira & Dias, 2011).

O perfil da transmissão da doença apresenta um novo cenário. Com os avanços no controle dos vetores domiciliares e rigorosa seleção de doadores de sangue, as vias alternativas cresceram de importância. Surto de transmissão oral tem sido detectados em áreas endêmicas. Algumas possibilidades para o mecanismo de transmissão oral na doença de Chagas são: ingestão de leite materno de mãe infectada, ingestão de sangue ou de carne mal cozida de mamífero infectado, especialmente reservatórios silvestres, ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com fezes ou urina de triatomíneos ou secreção para-anal de marsupiais infectados por *T. cruzi* (Dias & Macedo, 2005; Dias & Neto, 2011).

Os casos mais recentes de transmissão da doença de Chagas por alimento, no Brasil, estão relacionados ao consumo de açaí fresco. Em 2007, 100 ocorrências da doença foram registradas no país (ANVISA, 2008).

1.2. Aspectos da interação do *Trypanosoma cruzi* com o hospedeiro vertebrado

O *Trypanosoma cruzi* é um flagelado da ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, caracterizado pela presença de um único flagelo e do cinetoplasto, região da mitocôndria com arranjo característico de DNA (Brener, 1997). Esse parasito apresenta uma grande diversidade genética, com predomínio de propagação clonal e eventos ocasionais de recombinação gênica e são classificados atualmente em seis unidades típicas discretas (DTUs: denominadas *T. cruzi* I-VI (TcI-VI). Essas unidades possuem marcadores imunológicos e moleculares específicos. TcI e TcII são puras e as demais são híbridas. Distintas DTUs de *T. cruzi* podem apresentar diferentes características de virulência e patogênica. A cepa Y pertence à TcII, apresentando uma parasitemia irregular e uma baixa taxa de multiplicação. O clone Col 1.7G2 pertence a TcI, apresentando alta taxa de multiplicação, maior parasitemia e maior mortalidade. (Zingales, Andrade *et al.*, 2009).

A seguir a distribuição epidemiológica das DTUs em humanos da América do Sul (Figura 1):



Figura 1. Distribuição epidemiológica das DTUs em humanos na América do Sul. Prevalência das formas cardíacas e assintomáticas nos países ao Norte da linha pontilhada e das formas cardíacas, digestiva e assintomática ao Sul (Fonte: Zingales, 2011).

Durante o seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta as formas de proliferação conhecidas como amastigota e epimastigota (em hospedeiros vertebrados e invertebrados, respectivamente) e a forma tripomastigota, altamente infectante. Tripomastigotas são capazes de infectar um grande espectro de células de mamíferos (Yoshida, 2006). Em modelos experimentais da infecção por *T. cruzi*, células musculares, macrófagos, células do sistema nervoso periférico, como células de Schwann e células gliais entéricas são predominantemente infectadas (Brener, 1973), além de fibroblastos, células epiteliais e endoteliais (Schenkman, Andrews *et al.*, 1988). Villela & Villela, (1932) relataram parasitismo de astrócitos, micróglia e neurônios no SNC de cães jovens. Por sua vez, Da Mata, Camargos *et al.* (2000) descreveram parasitismo preferencial de astrócitos no cérebro e cerebelo de ratos infectados com diferentes populações de *T. cruzi*.

A interação entre tripomastigotas e as células-alvo é um processo complexo que pode envolver múltiplos fatores. Barrias, de Carvalho & de Souza. (2013) consideram que essa interação pode ser dividida em duas fases: adesão (incluindo reconhecimento e sinalização) e internalização. O reconhecimento envolve moléculas de adesão presentes nas superfícies tanto do parasito, quanto da célula-alvo, assim como moléculas secretadas pelo parasito também podem desempenhar importante papel nesse processo.

A seguir apresentamos uma síntese das moléculas de superfície do *T. cruzi* e moléculas presentes na membrana da célula-alvo consideradas terem importância no processo de internalização do parasito (Magdesian, Giordano *et al.*, 2001; Andrade & Andrews, 2004; Yoshida, 2006; de Souza, de Carvalho & Barrias, 2010; Walker, Oghumu *et al.*, 2014) (Quadro 1 e Figura 2):

Quadro 1 – Síntese das moléculas envolvidas na interação do *T. cruzi* com o hospedeiro vertebrado

Moléculas de superfície do <i>T. cruzi</i>	
gp82 e gp35/50	expressas sobre a superfície de tripomastigotas metacíclicos também estão envolvidas na invasão do parasito
gp83	empregado pelo parasita para anexar e entrar em células fagocíticas e não fagocíticas.
gp90	parece regular negativamente a invasão da célula hospedeira
Mucinas	seus resíduos de açúcar interagem com as células do hospedeiro
Oligopeptidase B e Tc80	tem sido implicadas em infecções de células hospedeiras
Penetrinas	apresentam uma afinidade para os elementos de matriz extracelular e promove adesão e penetração em fibroblastos
Tc85	caracteriza-se como parte da gp85, capaz de se ligar a diferentes hospedeiros.
Trans sialidases	conferem resistência ao complemento humano, um pré-requisito para a infecção
Moléculas presentes na membrana da célula-alvo	
Ácido siálico	parece estar envolvido na adesão e invasão de <i>T. cruzi</i>
Fibronectinas	podem interagir com sequências da Tc85
Galactina-3	tem sido sugerida para mediar a ligação e entrada do parasito nas células dendríticas e em células do músculo liso
Receptores de bradicinina	também são utilizados por tripomastigotas para penetrar em células de mamíferos
Receptor TGF- β	facilita a entrada do <i>T. cruzi</i> em células epiteliais

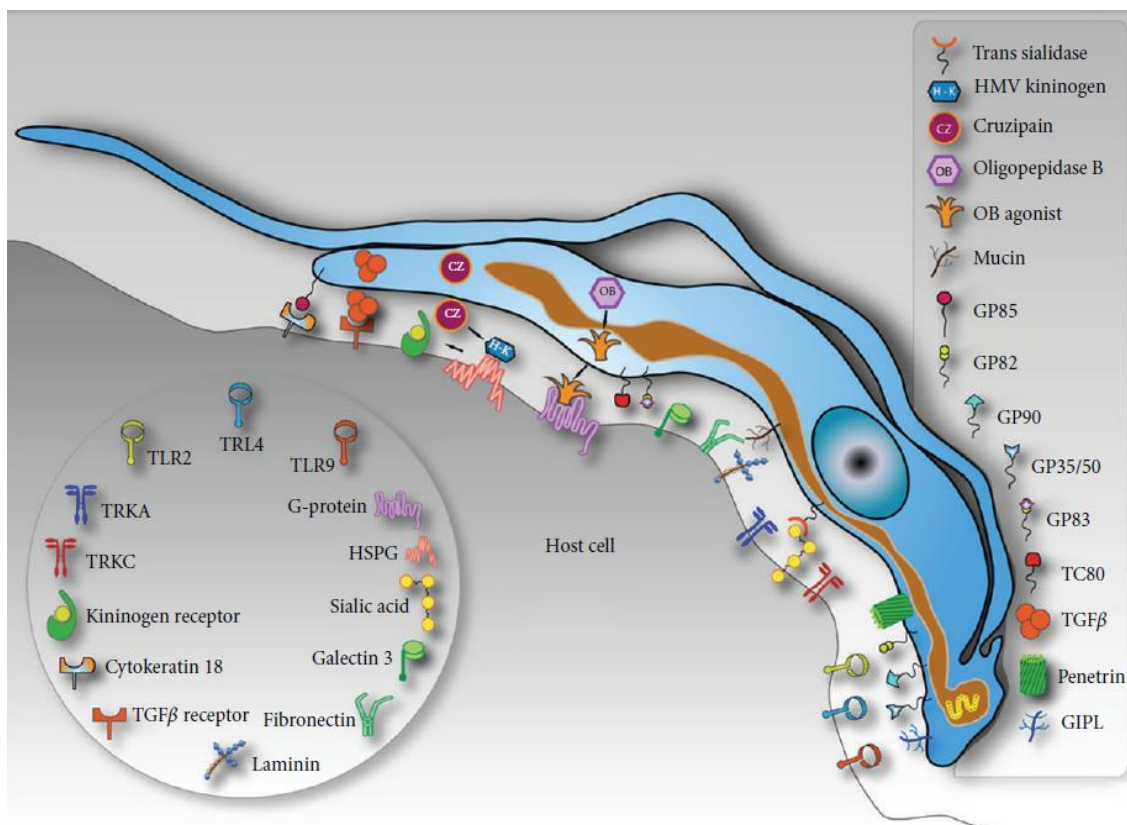


Figura 2. Moléculas envolvidas na interação entre célula hospedeira e *Trypanosoma cruzi* (Fonte: de Souza *et al.*, 2010).

Um dos mecanismos de internalização do *T. cruzi* é a fagocitose, quando as células emitem pseudópodes. Em fagócitos profissionais (tais como macrófagos) a ativação de proteínas tirosina quinase foi observada, seguido do recrutamento de PI-3-quinase e filamentos de actina. Esse é o principal mecanismo de entrada de *T. cruzi* em macrófagos. Em outro mecanismo conhecido como endocitose, a emissão de pseudópodes não ocorre, mas ocorre a participação de filamentos de actina. Tripomastigotas também podem entrar por invaginação da membrana, sem a participação de filamentos de actina. Este último processo tem sido considerado como uma forma ativa para a entrada do parasito com gasto de energia. Após a internalização, os tripomastigotas se alojam no compartimento vacuolar e inicia-se um processo de diferenciação do parasito em amastigotas (Ley, Nussenzweig *et al.*, 1990; Andrews, Abrams *et al.*, 1990; Andrade & Andrews, 2004; Yoshida, 2006; de Souza, de Carvalho & Barrias, 2010; Walker, Oghumu *et al.*, 2014).

Logo no início da infecção, o *T. cruzi* induz uma intensa resposta inflamatória, o que implica em produção de IL-12 e TNF- α por células dendríticas/macrófagos e interferon gamma (IFN- γ) por células natural killer (NK), desempenhando um papel crucial na patogênese da doença (Golgher & Gazzinelli, 2004). Posteriormente ocorre a ativação da imunidade adquirida, com a expansão de células TH1 CD4⁺, anticorpos de respostas específicas e geração de células CD8⁺ citotóxicas que destroem as células parasitadas (Benitez-Hernandez, Mendez-Enriquez *et al.* 2010).

Em modelos experimentais, é possível conhecer alguns dos eventos imunológicos que ocorrem durante as primeiras horas após a infecção. Observou-se que antígenos de *T. cruzi* induzem ativação de células NK antes da expansão dos linfócitos T. Durante esta fase, os macrófagos induzem uma cascata de citocinas: inicialmente eles produzem interleucina IL-12, que atua sobre as células NK para induzir a produção de IFN- γ , que por sua vez aumenta a produção de IL-12, fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico (NO) em macrófagos, contribuindo, assim, para a eliminação do parasita (Camargo, Andrade *et al.*, 1997; Rodrigues, Reis *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo, ambos os tipos de células sintetizam citocinas reguladoras, tais como a IL-10 e IL-4 para reduzir os efeitos prejudiciais associados com o excesso de estimulação do sistema imune (Sathler-Avelar, Vitelli-Avelar *et al.*, 2009).

Basso (2013) sugere que os níveis de IL-6 e TNF- α parecem ser marcadores anteriores do desfecho fatal da carga parasitária em camundongos, assim como a ação de mediadores solúveis, como a IL-12, IL-18, IFN- γ e o NO são cruciais para inibir a replicação do parasito e eliminá-lo.

Em pacientes imunossuprimidos, o *T. cruzi* pode causar danos ao SNC, como relatado nos casos de tratamento após transplantes ou enxertos e em casos de infecção pelo HIV. Nesses casos, os pacientes desenvolvem meningoencefalite, hipertensão intracraniana, déficits neurológicos focais e lesões do SNC devido à reativação da infecção local (Pittella, 1993). Durante o seu detalhado estudo, Carlos Chagas já relatava um eventual comprometimento do sistema nervoso, principalmente em crianças (Chagas, 1909). Pacientes chagásicos com idade inferior a dois anos e adultos em estado de imunodeficiência podem desenvolver meningoencefalite aguda grave (Pittella, 1993; Lages-Silva, Ramirez *et al.*, 2002). De modo semelhante, ratos em fase de amamentação, infectados com tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* mostram maior comprometimento do SNC (Silva, Nagib *et al.*, 2004). Entretanto, a eliminação de

macrófagos por administração de clodronato reduziu o parasitismo, indicando que macrófagos interferem no processo de invasão do SNC pelo *T. cruzi*. Nessa condição, há menor expressão de ocludina em células endoteliais (desestabilização de zônulas de oclusão), menor expressão de I-CAM pelas células endoteliais e diminuição acentuada do parasitismo de astrócitos (Silva, Nagib *et al.*, 2004).

1.3. Células da glia

Os astrócitos são células gliais que possuem importantes propriedades fisiológicas importantes para a homeostase do SNC: afetam a função neuronal pela liberação de fatores neurotróficos, guiam o desenvolvimento neuronal, contribuem para o metabolismo de neurotransmissores, participam da plasticidade sináptica, influenciam na barreira hematoencefálica (BHE) (Dong & Benveniste, 2001), cuja proximidade estreita dos seus pés terminais sobre a superfície exterior ao endotélio e da respectiva membrana basal são fundamentais na formação e a atividade secretora é essencial para a manutenção da integridade da barreira (Abbott, 2002).

As micróglias são macrófagos residentes no SNC, que após uma infecção, exposição a estímulos inflamatórios ou interação com células derivadas do sangue no tecido, tornam-se ativas para executar várias funções imunes inatas, incluindo o reconhecimento e eliminação de patógenos invasores, a indução da inflamação, citotoxicidade e a regulação de respostas das células T através de apresentação de antígenos (Aloisi, 2001).

Em resposta a um dano no tecido nervoso, células da glia comumente liberam mediadores pró-inflamatórios, radicais livres e proteases como um esforço para restabelecer a homeostase do tecido (Aloisi, 2001; Dong & Benveniste, 2001). No entanto, o excesso de produção dessas substâncias devido a persistentes estimulações antigênicas resulta em morte neuronal (Bombeiro, Gonçalves *et al.*, 2012).

A proliferação de astrócitos e de micróglia é uma reação comum a danos no SNC (Giulian & Baker, 1985) que visa restabelecer a homeostase local. Considerados macrófagos residentes do SNC, micróglias quando ativadas liberam substâncias que são neurotóxicas em concentrações elevadas (Aloisi, 2001). Além disso, vários estudos tem demonstrado que os astrócitos também realizam funções imunes (Dong & Benveniste, 2001), como a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Aloisi, Ria *et al.*, 1999).

1.4. Barreira hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira seletiva que mantém o equilíbrio homeostático no SNC e o protege contra agentes patogênicos. Em vertebrados, a BHE é formada por células endoteliais cerebrais, especificamente pelas zônulas de oclusão entre essas células. Outros componentes do SNC que interferem com a integridade da BHE são a lâmina basal, os pericitos e astrócitos (Weiss, Cazaubon *et al.*, 2009).

A membrana basal dos capilares cerebrais constitui fator importante para a BHE, sustentando a própria célula endotelial e o compartimento glial (Bernstein, 1985, Brito *et al.*, 2010).

Os pés terminais de astrócitos cobrem 90% da superfície cerebrovascular e restringe a permeabilidade do leito vascular e tem papel importante na migração de células sanguíneas para o parênquima cerebral (Li, 2005) e são fundamentais na formação e manutenção da BHE (Abbott, 2002).

Pericitos estão ativamente envolvidos na manutenção na permeabilidade da BHE (Weiss, Cazaubon *et al.*, 2009).

A BHE também desempenha um importante papel na regulação homeostática do microambiente cerebral necessária para a homeostase do SNC (Abbott, 2002).

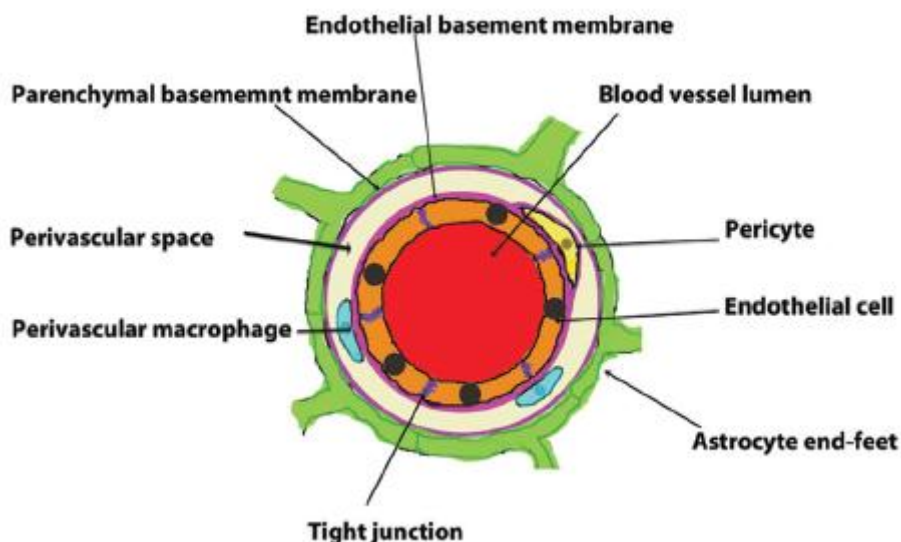


Figura 3. Ilustração de um vaso capilar mostrando a BHE, que consiste de um complexo sistema de junções de oclusão em células endoteliais cerebrais. Observam-se pericitos, membrana basal e pés terminais de astrócitos. (Fonte: Masocha & Kristensson, 2012).

1.5. TNF- α

Sabe-se que o TNF- α é capaz de induzir a perda da integridade da BHE (Carvey, Hendey & Monahan, 2009). Ademais, a ativação do endotélio por TNF- α leva à maior expressão de moléculas de adesão como I-CAM (Ren, Zhao et al., 2010; van Buul, van Rijssel *et al.*, 2010). Sabe-se também que em presença de TNF- α há uma redução de GFAP (glial fibrillar acidic protein), filamento intermediário característico de astrócitos (Cardoso, Brites & Brito, 2010), mas os mecanismos envolvidos nestes eventos permanecem obscuros.

Pinto, Sales e colaboradores (2011) demonstraram que o TNF- α facilita a entrada de *T. cruzi* em células epiteliais LLC-MK2 (linhagem celular epitelial de rim de macaco) e HEK293T (linhagem celular de rim embrionário humano) nas primeiras horas de infecção. O aumento do número intracelular de parasitos nas células tratadas foi claramente dependente da concentração da citocina (Pinto, Sales *et al.*, 2011).

O fato de TNF- α aumentar a susceptibilidade de células epiteliais à infecção pelo *T. cruzi* parece indicar que a interação do parasito com a célula hospedeira depende de inúmeros fatores, dentre eles o microambiente em que ela está inserida.

Dados preliminares obtidos no laboratório Prof^a. Conceição Machado (ICB/UFGM) indicam que em cardiomiócitos os efeitos do tratamento com TNF- α são distintos daqueles descritos acima para células epiteliais (dados não publicados).

Desse modo, torna-se relevante avaliar os efeitos do TNF- α sobre invasão de astrócitos e micróglia por duas populações de *T. cruzi*, a cepa Y e o clone Col 1.7G2.

2. Objetivos

Avaliar os efeitos do tratamento com TNF- α sobre a infecção de células da glia pela cepa Y e pelo clone Col 1.7G2 de *Trypanosoma cruzi*.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do tratamento com TNF- α sobre a infecção de astrócitos e de micróglia pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*:

- (i) O percentual de células infectadas;
- (ii) O número de parasitos intracelulares;
- (iii) Correlacionar os dados de infecção pelo *T. cruzi* com a ação do TNF- α .

3. Metodologia

3.1. Cultivo celular

Astrócitos e micróglia foram cultivados em garrafas T175, contendo meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de baixa glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (PS). As garrafas foram mantidas em uma incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultura era trocado a cada semana e substituído por meio novo.

3.1.1. Isolamento de astrócitos e micróglia

Astrócitos e micróglia foram isolados de cérebros de ratos Holtzman neonatos com até 24 horas pós-nascimento (Seregi, Keller *et al.*, 1984). Todo o procedimento foi realizado no fluxo laminar e com materiais cirúrgicos estéreis.

Para retirada do cérebro, os animais foram decapitados com uma tesoura e dois cortes foram feitos na calota a partir do lado occipital, acima do pavilhão auditivo sobre os olhos em direção à ponta do focinho. Os cérebros foram retirados com uma pequena espátula-colher e colocados em uma placa contendo tampão fosfato-salino (PBS-phosphate buffered saline) gelado. Os hemisférios foram retirados e separados do mesencéfalo, do tronco cerebral e do cerebelo. As meninges foram removidas e o tecido foi homogeneizado, filtrado em membrana de 70 µm e centrifugado a 1000 rpm por 3 vezes durante 10 minutos cada. Em seguida, as células foram ressuspensas em garrafas de cultura com meio DMEM contendo 10% SFB e 1% PS. As garrafas foram mantidas em uma incubadora a 37 °C e 5% de CO₂.

Essa cultura primária continha astrócitos e micróglias. Os astrócitos aderem ao fundo da garrafa, enquanto as micróglias eram coletadas do sobrenadante resultante da cultura.

Após atingir a confluência, momento em que os astrócitos param de proliferar por causa da inibição por contato, essas células foram levadas para o shaker orbital à 37°C e 150 rpm overnight e posteriormente o meio DMEM foi substituído por um meio novo. No dia seguinte as células passaram por um tratamento de 4 dias com citosina-arabinosídeo (AraC), um fármaco anti-mitótico que inibe a replicação do DNA e, impede a proliferação de micróglias de outros contaminantes, obtendo assim uma cultura de astrócitos pura. Em seguida, os astrócitos foram congelados em DMSO e imediatamente armazenados à - 70°C.

Micróglias eram coletadas do sobrenadante da cultura primária e plaqueadas em lamínulas de vidro no momento do experimento.

3.1.2. Manutenção da cepa Y

Tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* foram obtidos a partir do sangue de camundongos infectados no Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas (ICB-UFMG), coordenado pelo professor Dr. Egler Chiari e congelados em meio contendo 90% de Dimetsulfoxido (DMSO) e 10% de SFB.

Os parasitos eram descongelados e mantidos em culturas de células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2) cultivadas em meio DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de PS, mantidas em estufa umidificada, a 37° C e 5% de CO₂. Trocas do meio eram realizadas a cada dois dias. Após o 7° dia, o sobrenadante contendo tripomastigotas era coletado em tubo falcon, centrifugado por 10 minutos a 2200 rpm, e a seguir mantidos em estufa com atmosfera úmida por, pelo menos, duas horas, para que os tripomastigotas nadassem no sobrenadante e se separassem de amastigotas e restos celulares de células rompidas, que permanecem no pellet. A seguir, o sobrenadante era coletado e o número de tripomastigotas viáveis estimado em câmara de Neubauer. Após a contagem, uma nova cultura de células LLC-MK2 era infectada na proporção de 3×10^6 parasitos. Os parasitos eram mantidos por, no máximo, 6 passagens para que não ocorressem alterações na virulência dos mesmos.

3.1.3. Manutenção do clone Col 1.7G2

Tripomastigotas do clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* também foram obtidos a partir do sangue de camundongos infectados no Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas (ICB-UFMG), coordenado pelo professor Dr. Egler Chiari e congelados em meio contendo 90% de DMSO e 10% de SFB.

A manutenção dos parasitos foi semelhante à cepa Y, entretanto o meio DMEM era trocado todos os dias.

3.2. Padronização do Ensaio: Quantificação de parasitos em infecção de astrócitos pela cepa Y de *T. cruzi*

Astrócitos foram plaqueados em lamínulas circulares de vidro tratadas em poli-L-lisina em placas de 24 poços e na densidade $1,5 \times 10^5$ células por poço.

Após 24 horas, os astrócitos foram infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* nas proporções de 10:1 (3×10^6 parasitos/ml), 5:1 ($1,5 \times 10^6$ parasitos/ml) e 2:1 (6×10^5 parasitos/ml). Após 2 horas de incubação o meio contendo os parasitos foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS. Um novo meio DMEM contendo 2% de SFB e 1% de PS foi adicionado à cultura, que foi levada para a estufa a 37°C.

Após tempos previamente definidos (2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 30, 36 ou 42 horas após a infecção), as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato e posteriormente tratadas com o marcador nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) na concentração de 1/250 μ l, para a contagem das células.

Para os tempos entre 2 e 8 horas, além da marcação com DAPI, também foi utilizada imunofluorescência com anticorpo primário anti-*T.cruzi* obtido em coelho e conjugado com anticorpo secundário Alexa 488 goat anti-rabbit, para observação de parasitos não internalizados e aderidos à membrana.

3.3. Padronização do Ensaio: Tratamento com TNF e infecção de astrócitos e micróglia com a cepa Y e com o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*

Astrócitos e micróglia foram plaqueados em lamínulas circulares de vidro tratadas em poli-L-lisina em placas de 24 poços e na densidade $1,5 \times 10^5$ células por poço.

Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas por 6 horas nas seguintes concentrações de TNF- α : 0, 5, 10, 20 a 50ng/ml. Após o tratamento, as células foram infectadas com tripomastigotas da cepa Y ou do clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* na proporção de 2:1 (3×10^5 parasitos/ml). Após 2 horas de incubação o meio contendo os parasitos foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS. Um novo meio DMEM contendo 2% de SFB e 1% de PS foi adicionado à cultura, que foi levada para a estufa a 37°C.

Após tempos previamente definidos, as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% e posteriormente tratadas com o marcador nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) para a contagem das células.

Para os tempos entre 2 e 8 horas, além da marcação com DAPI, também foi utilizada imunofluorescência com anticorpo primário anti-*T.cruzi* obtido em coelho e conjugado com anticorpo secundário Alexa 488 goat anti-rabbit, na concentração de 1/500µl.

3.4. Determinação do percentual de células infectadas e da taxa de infecção

Após a marcação do DNA nuclear e do cinetoplasto com DAPI, a percentagem (%) de células infectadas (número de células infectadas/número de células total), assim como a taxa de infecção (número de parasitos intracelulares/número de células infectadas) foram avaliados mediante contagem do número de amastigotas intracelulares e do número de células infectadas. Esta análise foi conduzida em microscópio de fluorescência Axioplan-2 da Zeiss (objetiva de imersão com aumento de 63X). Em cada lamínula foi contada uma média de 10 campos aleatórios, totalizando um número mínimo de 500 células. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5. Imunocitoquímica em microscopia de fluorescência

Para determinar a pureza de astrócitos na cultura primária, foi utilizado o anticorpo anti-GFAP (proteína glial fibrilar acídica) para a identificação de filamentos intermediários. Após a fixação em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato das lamínulas contendo a cultura, as células foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com solução de bloqueio de ligações inespecíficas (0,1g de BSA diluído em 10ml de PBS + 10µl de Tween 20) por 1 hora. Em seguida, lavadas em PBS, 1 vez por 2 minutos, incubadas com o anti-GFAP obtido em coelho na concentração de 1:500 (diluído em 10% da solução de bloqueio e 90% de PBS) e mantidas em câmara úmida a 4° overnight. Posteriormente, lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário Alexa 488 goat anti-rabbit na concentração de 1:400 (diluído em 10% da solução de bloqueio e 90% de PBS). Em seguida lavadas em PBS (3 vezes de 5

minutos) e incubadas, incubadas com DAPI (1:250) por 5 minutos, lavadas com PBS, 1 vez por 5 minutos e montadas em lâminas sob lamínulas com um montante contendo 90% de glicerol e 10% de Tris HCl 1M com pH final 9,0.

Para determinar a pureza de micróglias na cultura primária, foi utilizado o anticorpo anti-IBA1, que reconhece uma proteína quelante de Ca^{++} presente no citoplasma microglial. Após a fixação em paraformaldeído 4% das lamínulas contendo a cultura, as células foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com solução de bloqueio de ligações inespecíficas por 1 hora. Em seguida, lavadas em PBS, 1 vez por 2 minutos, incubadas com o anti-IBA1 obtido em coelho na concentração de 1:500 (diluído em 10% da solução de bloqueio e 90% de PBS) e mantidas em câmara úmida a 4° overnight. Posteriormente, lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário Alexa 488 goat anti-rabbit na concentração de 1:400 (diluído em 10% da solução de bloqueio e 90% de PBS). Em seguida lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com DAPI (1:250) por 5 minutos, lavadas com PBS, 1 vez por 5 minutos e montadas em lâminas sob lamínulas com um montante contendo 90% de glicerol e 10% de Tris HCl 1M com pH final 9,0.

Para identificar parasitos não internalizados, aderidos às membranas das células avaliadas nos tempos inferiores a 8 horas, foi utilizado o anticorpo anti-*T. cruzi*. Após a fixação em paraformaldeído 4% das lamínulas contendo a cultura, as células foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com solução de bloqueio de ligações inespecíficas por 1 hora. Em seguida, lavadas em PBS, 1 vez por 2 minutos, incubadas com o anti- *T. cruzi* obtido em coelho na concentração de 1:500 (diluído em 10% da solução de bloqueio e 90% de PBS) e mantidas em câmara úmida a 4° overnight. Posteriormente, lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas com o anticorpo secundário Alexa 488 goat anti-rabbit na concentração de 1:400 (diluído em 10% da solução de bloqueio e 90% de PBS). Em seguida lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos) e incubadas, incubadas com DAPI (1:250) por 5 minutos, lavadas com PBS, 1 vez por 5 minutos e montadas em lâminas sob lamínulas com um montante contendo 90% de glicerol e 10% de Tris HCl 1M com pH final 9,0.

As análises foram conduzidas em microscópio de fluorescência Axioplan-2 da Zeiss (objetiva de imersão com aumento de 63X). Em cada lamínula foi contada uma média de 10 campos aleatórios, totalizando um número mínimo de 500 células.

3.6. Análises estatísticas

Para análises estatísticas dos dados foi utilizado o programa Prism 5.1 e o teste One-way ANOVA Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn.

4. Resultados

4.1. Cultivo celular

4.1.1. Cultura primária de astrócitos

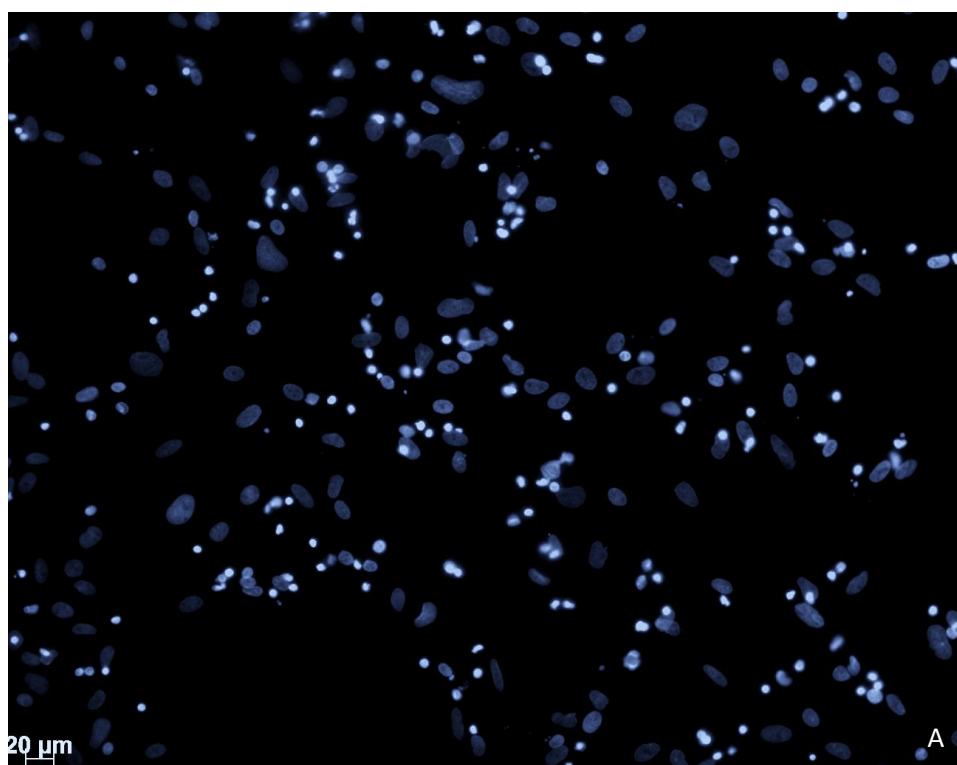
Para identificação de astrócitos isolados utilizou-se anticorpo anti-GFAP (Figura 4). A possibilidade de contaminação da cultura por micróglia foi avaliada pela imunomarcagem desse tipo celular com o anticorpo anti-IBA1. O percentual de micróglia na cultura de astrócitos foi menor que 5% e, portanto, considerou-se a pureza da cultura primária de astrócitos maior que 95%.

Os astrócitos na cultura primária apresentavam os prolongamentos característicos que irradiam a partir de seu corpo celular e permaneciam viáveis em cultura por quase 3 meses.

4.1.2. Cultura primária de micróglia

A identificação de micróglia baseou-se na imunofluorescência positiva para anti-IBA1 (Figura 5). A pureza da cultura foi superior a 95%.

As micróglia apresentavam-se como pequenas esferas nas garrafas de cultura contendo astrócitos. Após serem coletadas e plaqueadas, apresentavam aspecto fusiforme. Essas células permaneciam viáveis em cultura por somente 3 dias.



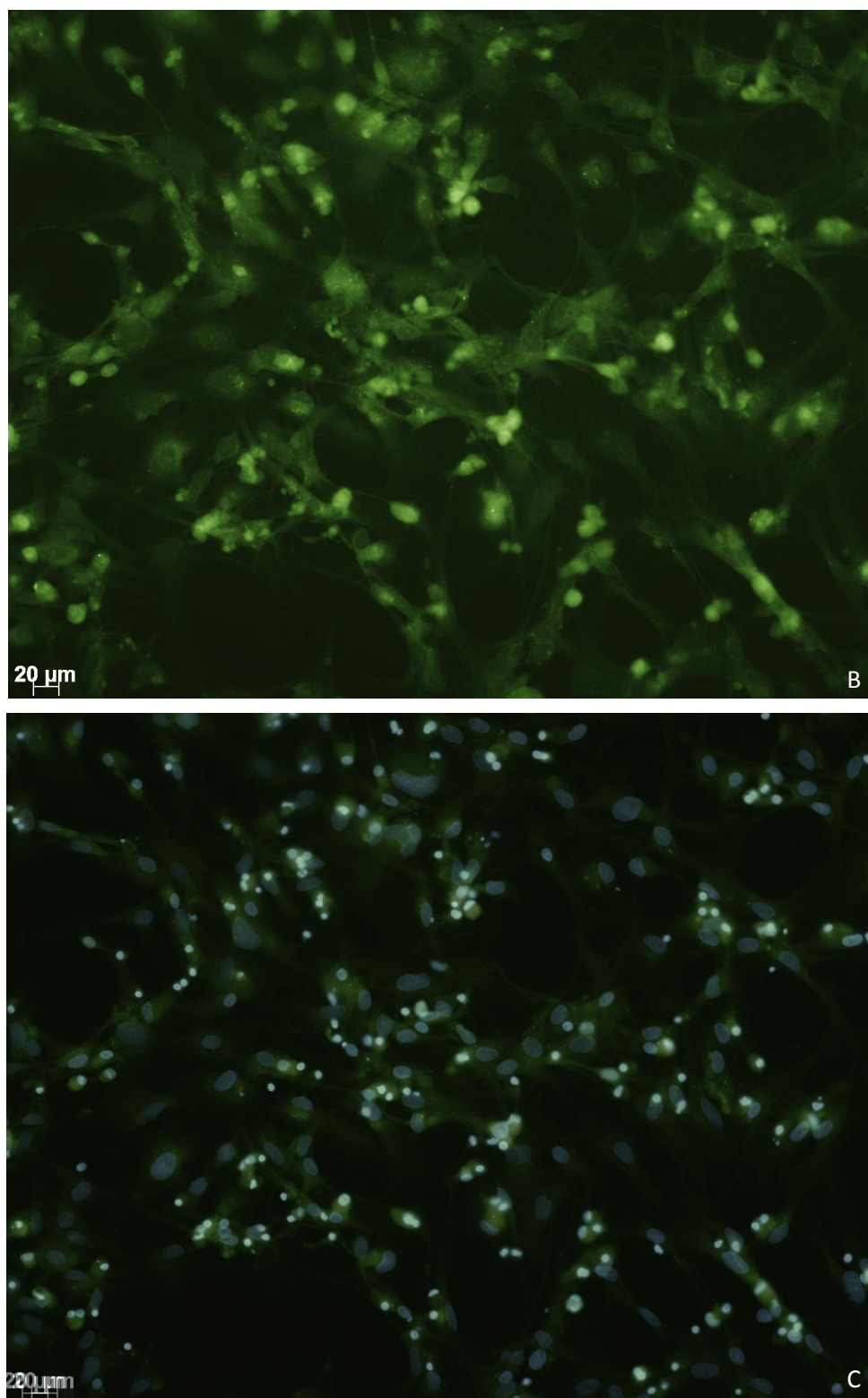
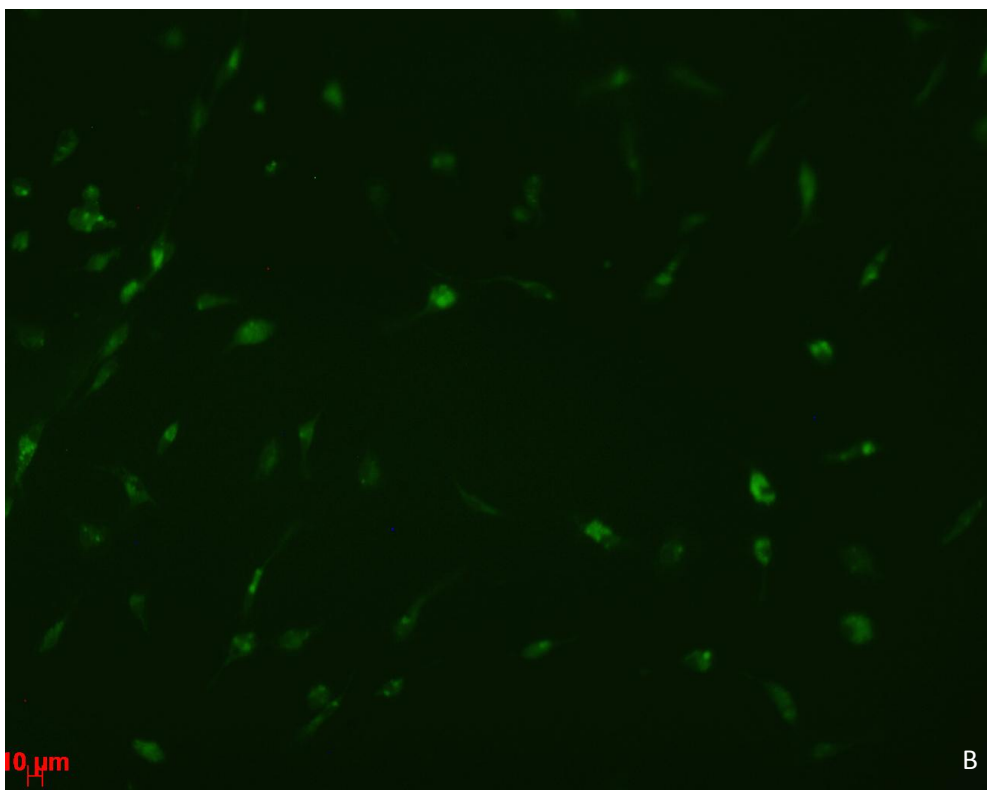
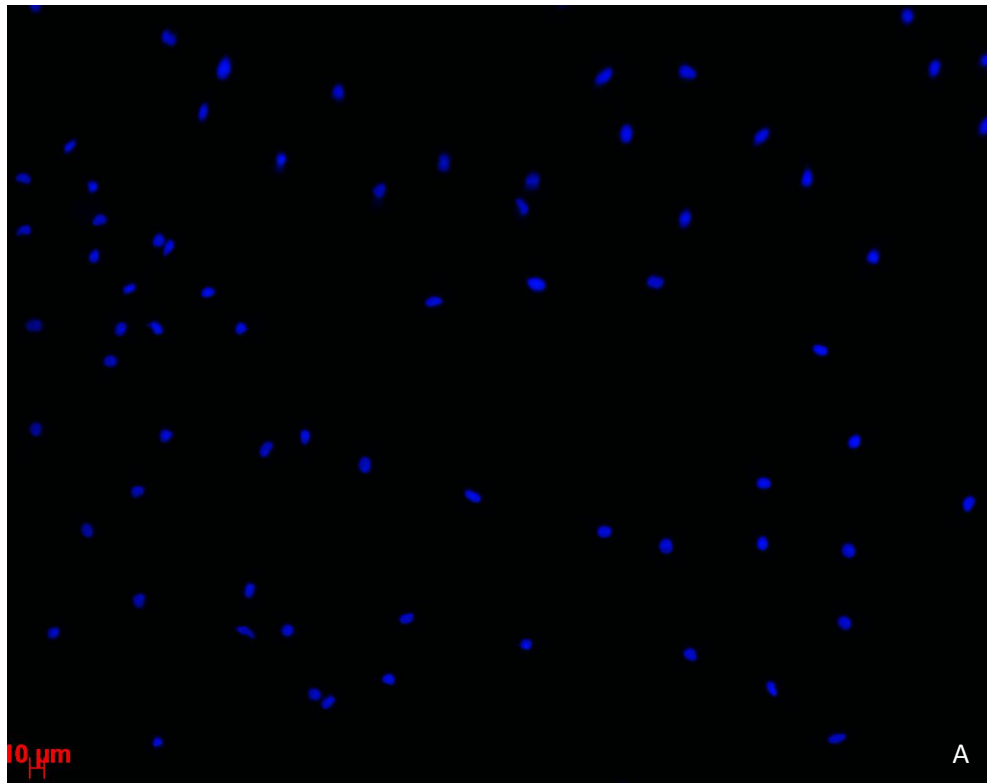


Figura 4. Cultura primária de astrócitos. Imunofluorescência com anti-GFAP. **A:** marcação nuclear com DAPI; **B:** imunomarcação com anti- GFAP; **C:** sobreposição das imagens.



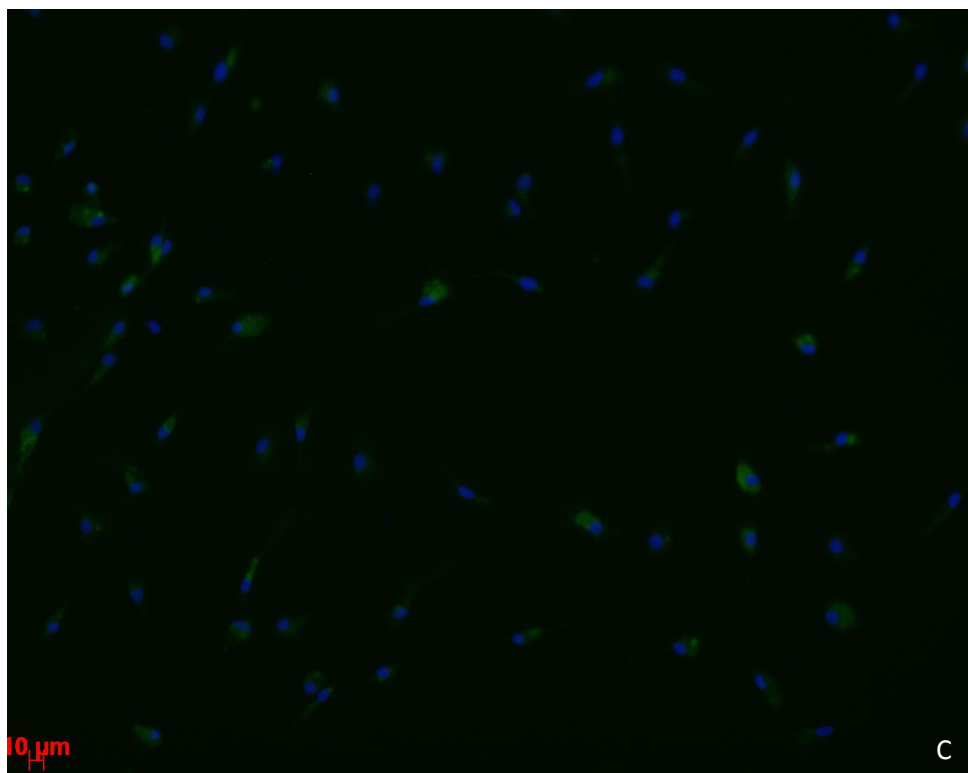


Figura 5. Cultura primária de micróglia. Imunofluorescência com anti-IBA1. **A:** marcação nuclear com DAPI; **B:** imunomarcação com anti-IBA1; **C:** sobreposição das imagens.

4.2. Infecção de astrócitos e micróglia com *T. cruzi*

Astrócitos foram inicialmente infectados com a cepa Y de *T. cruzi* na proporção de 10:1 e analisados durante os intervalos de tempo previamente definidos, conforme descrito em material e métodos.

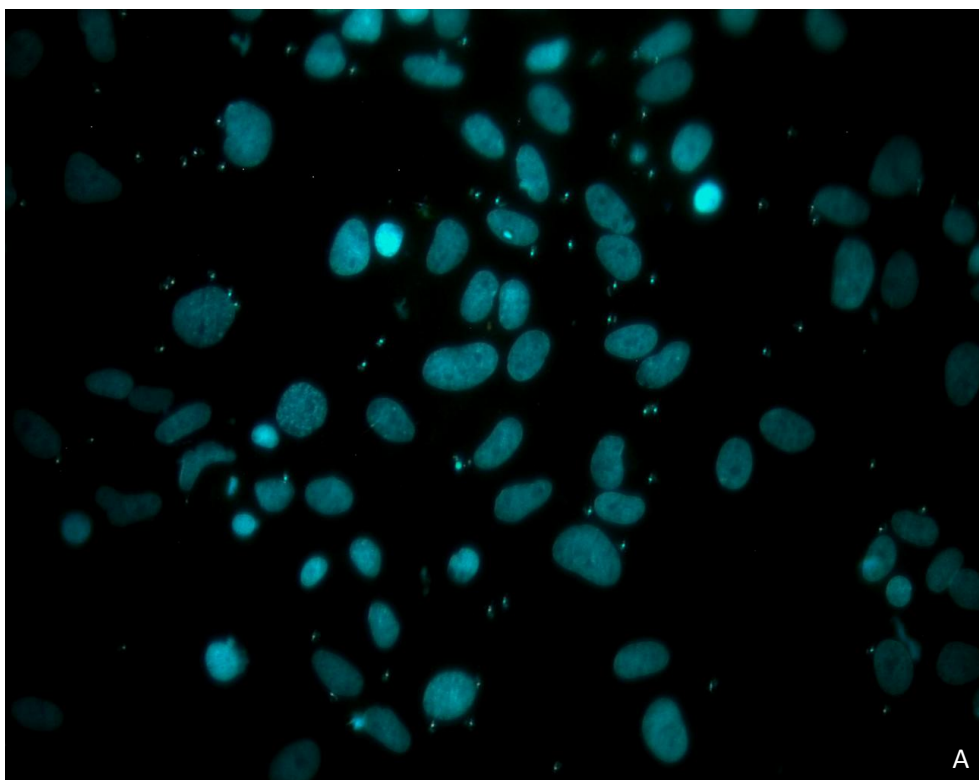
Nos intervalos de tempo inferiores a 8 horas, é possível observar parasitos não internalizados, porém aderidos às membranas dos astrócitos. Para a realização das contagens nesses intervalos de tempo, além da marcação nuclear com o DAPI, foi realizada a imunofluorescência com o anticorpo anti-*T.cruzi* (Figura. 6). A quantidade desses parasitos não internalizados foi inferior a 5%, em todos os tratamentos realizados.

Observou-se que após 24 horas da infecção, algumas células começavam a se romper, tornando inviável a contagem após esse tempo. Desse modo, ficou determinado que o limite de tempo estabelecido para análise seria o de 24 horas.

Astrócitos foram infectados com a cepa Y de *T. cruzi* nas proporções de 10:1, 5:1 e 2:1 parasitos/célula. A infecção de astrócitos na proporção de 10:1 parasitos célula resultou em percentual de 70 a 90% de células infectadas no período entre 2 a 24 horas de infecção. Nesse período, o número de amastigotas intracelulares variou de 220 a 300 parasitos/100 células infectadas (Figura 7).

Utilizando-se a proporção de 5:1, a porcentagem de células infectadas variou de 60 a 90% e a taxa de infecção de 220 a 260 parasitos/ cem células, no período entre 2 a 24 horas de infecção. Já na proporção de 2:1, a percentagem (%) de astrócitos infectados ficou em torno de 40-50%. O numero de parasitos intracelulares variou de 180 a 200 parasitos/100 células infectadas no período de 2 a 24 horas após a infecção (Figura 7).

Tendo em vista esses resultados, optou-se por utilizar a proporção de 2:1 parasitos/célula para o estudo dos efeitos do TNF- α sobre a infecção de astrócitos com a cepa Y. Esse estudo foi realizado nos períodos de 2 e 24 horas após infecção, tendo em vista que nos períodos intermediários não se observou diferença significativa no percentual e células infectadas e no número de amastigotas intracelulares.



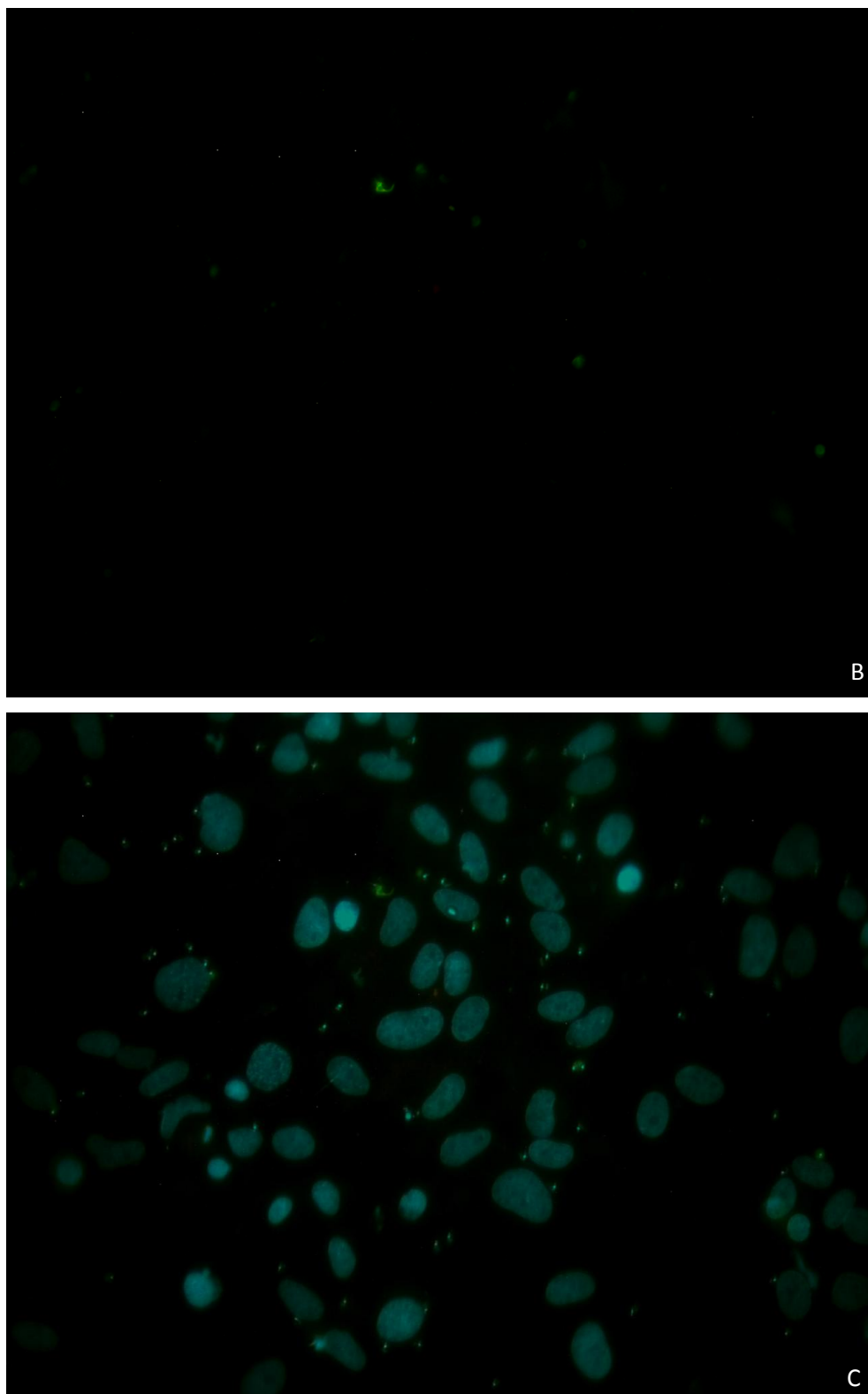


Figura 6. Cultura primária de astrócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* na proporção de 10 parasitos/célula. **A:** marcação nuclear com DAPI. **B:** imunomarcação com anti-*T. cruzi*; **C:** sobreposição das imagens.

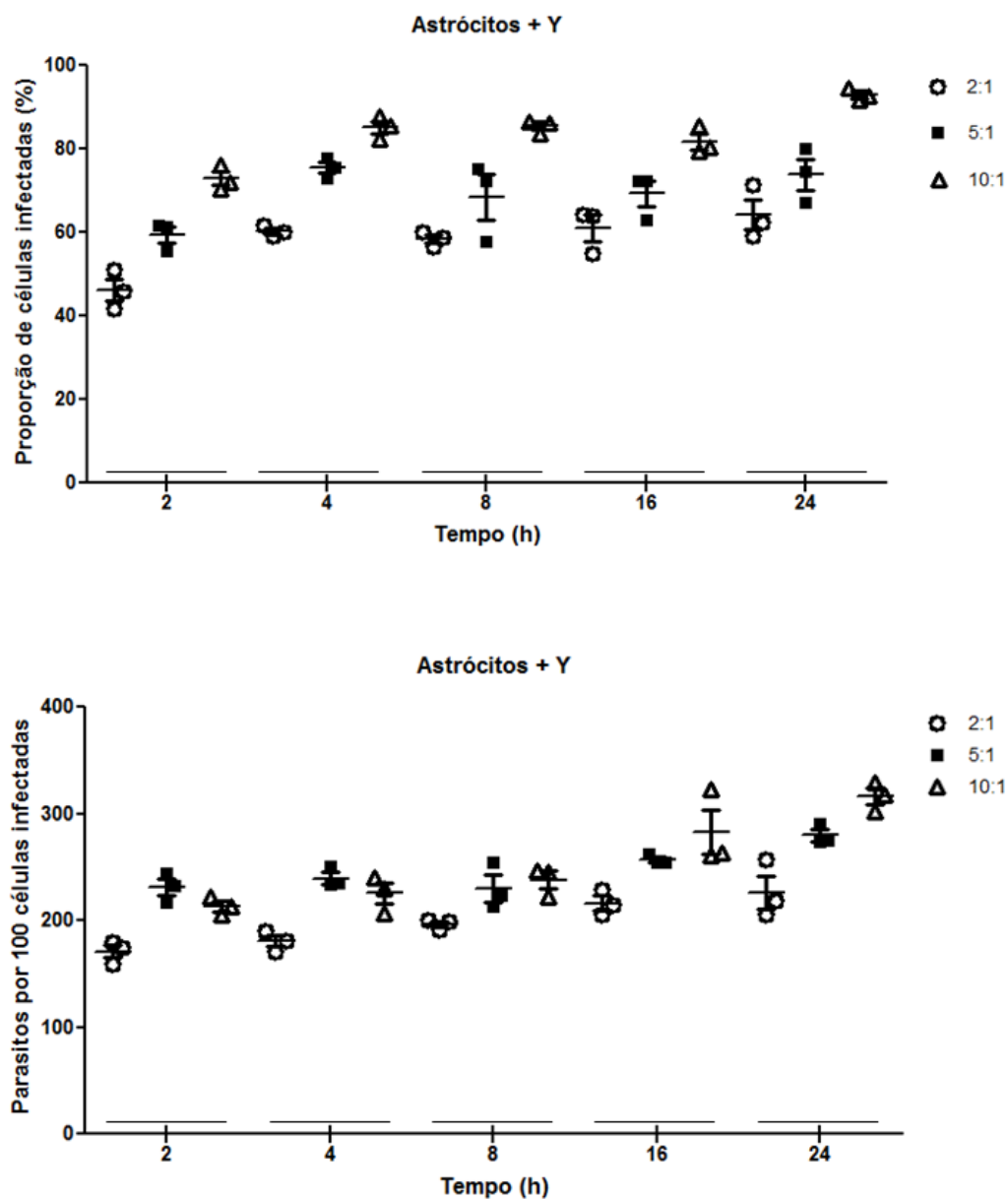
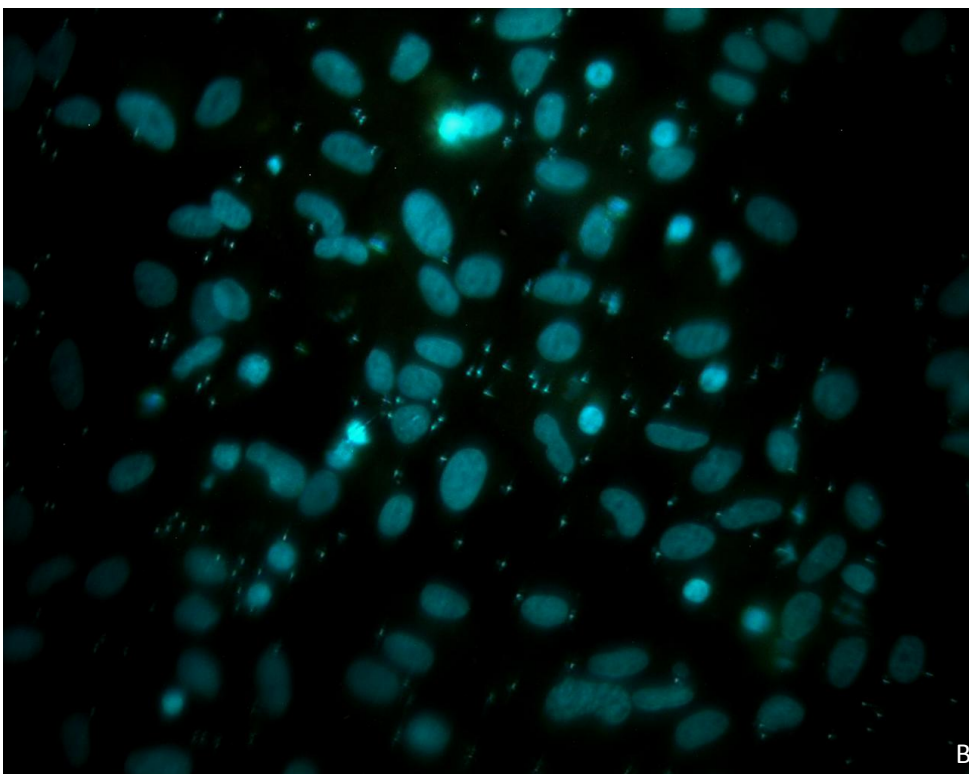
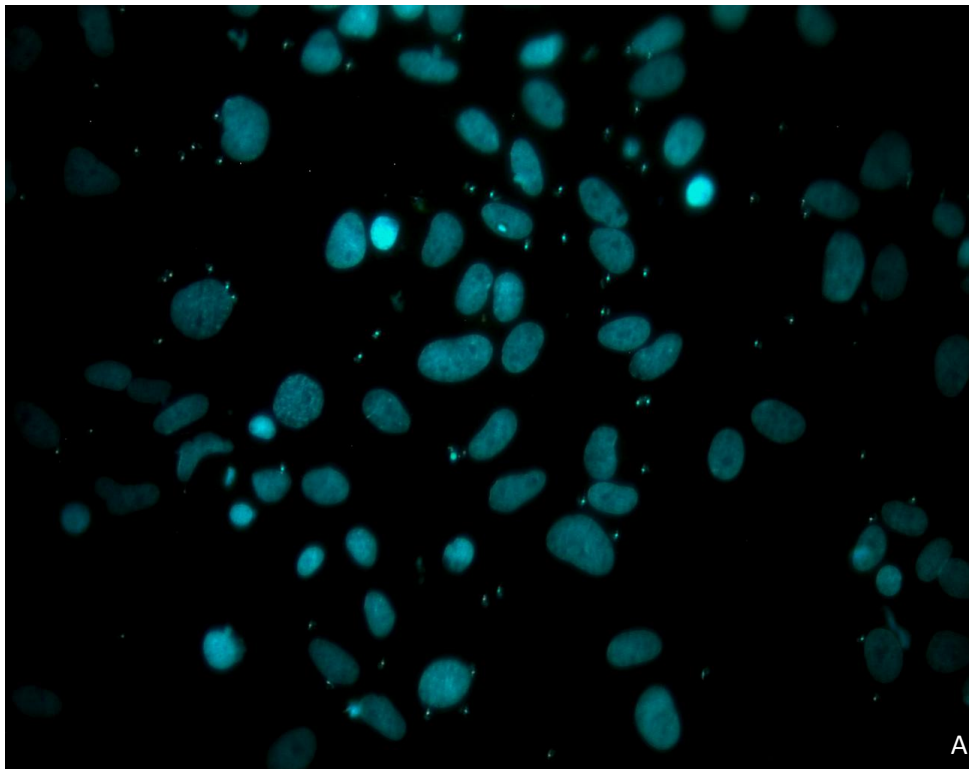


Figura 7. Infecção de astrócitos por tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* nas proporções de 2:1, 5:1 e 10:1 parasitos por célula. **A:** Percentual de astrócitos infectados. **B:** Número de amastigotas por 100 células.

A mesma proporção (2:1) foi utilizada para a infecção de astrócitos com o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*.

Somente astrócitos foram avaliados nas três proporções de parasitos/célula (10:1, 5:1 e 2:1). Todos os demais experimentos foram avaliados na proporção de 2:1.



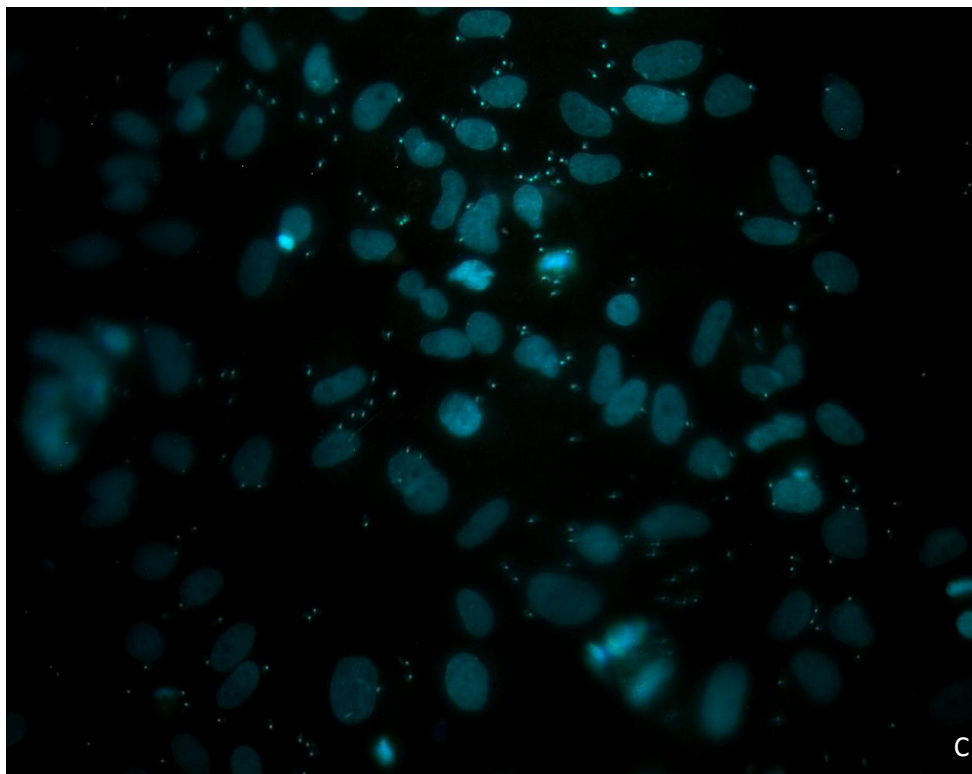


Figura 8. Imagem representativa de astrócitos infectados com cepa Y de *T. cruzi* nas seguintes proporções de parasitos/célula: A (2:1); B (5:1); C (10:1).

4.3. Determinação da concentração de TNF- α a ser utilizada na infecção de astrócitos pela cepa Y e pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*.

O tratamento dos astrócitos com 20ng/ml de TNF- α , por 6 horas, resultou em aumento significativo da porcentagem de células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* em relação aos tratamentos com 0ng e 5ng/ml de TNF- α , no tempo de 2 horas após a infecção (Figura 9A). No tempo de 24 horas após a infecção, os astrócitos tratados com 20ng apresentaram um aumento significativo sobre a porcentagem de células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* somente em relação aos tratados com 5ng (Figura 9C).

Astrócitos infectados pelo clone Col 1.7G2 não apresentaram diferença significativa na porcentagem de células infectadas em qualquer das doses de TNF- α testadas, 2 e 24 horas após a infecção (Figura 9B e D).

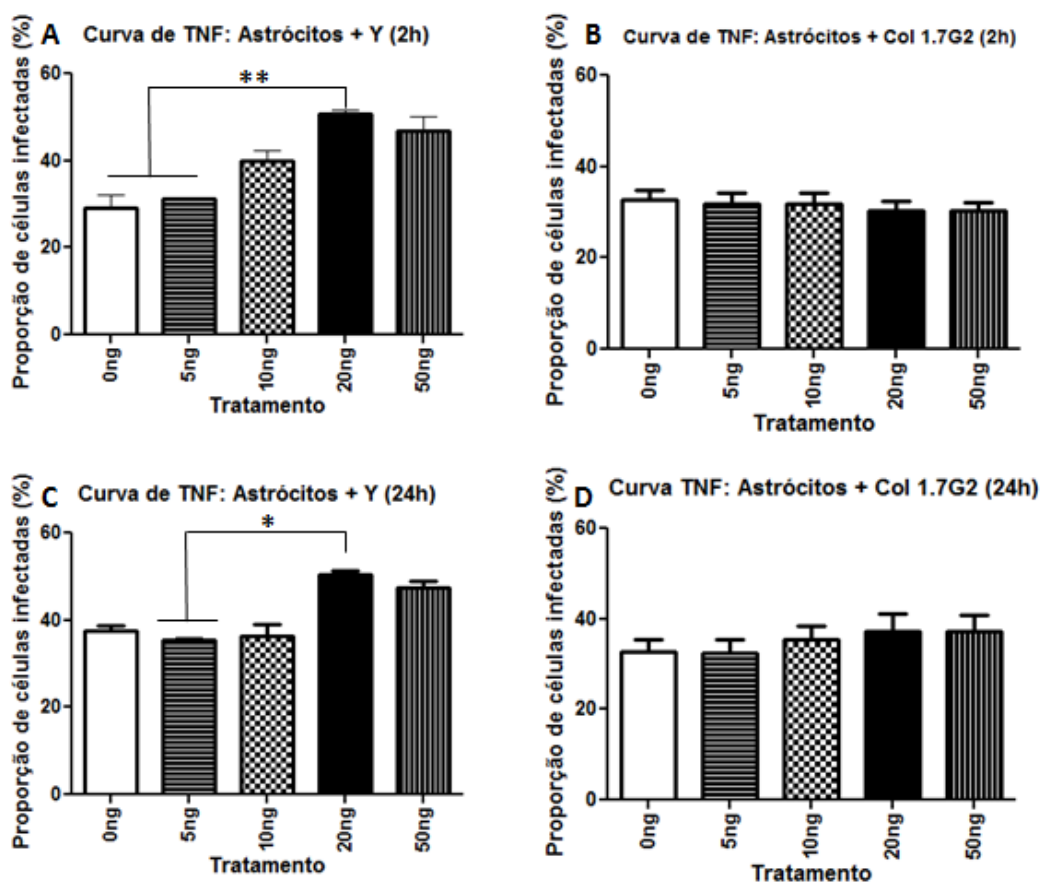


Figura 9. Percentagem de astrócitos infectados pelas cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α . A: Duas horas após infecção com cepa Y (n=6). B: Duas horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9). C: 24 horas após infecção pela cepa Y (n=6). D: 24 horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9). * $p < 0,03$; ** $p < 0,0003$.

O número de parasitos/100 células infectadas aumentou significativamente após o tratamento dos astrócitos com TNF- α nas concentrações de 20 e 50ng/ml em relação ao controle, 2 horas após a infecção com a cepa Y de *T. cruzi* (Figura 10). Esse efeito não se repetiu no tempo de 24 horas de infecção com essa cepa. Em qualquer das concentrações utilizadas, TNF- α não alterou a proporção de células infectadas com o clone Col1.7G2, assim como o número de parasitos/100 células, nos tempos de 2 e 24 horas após a infecção.

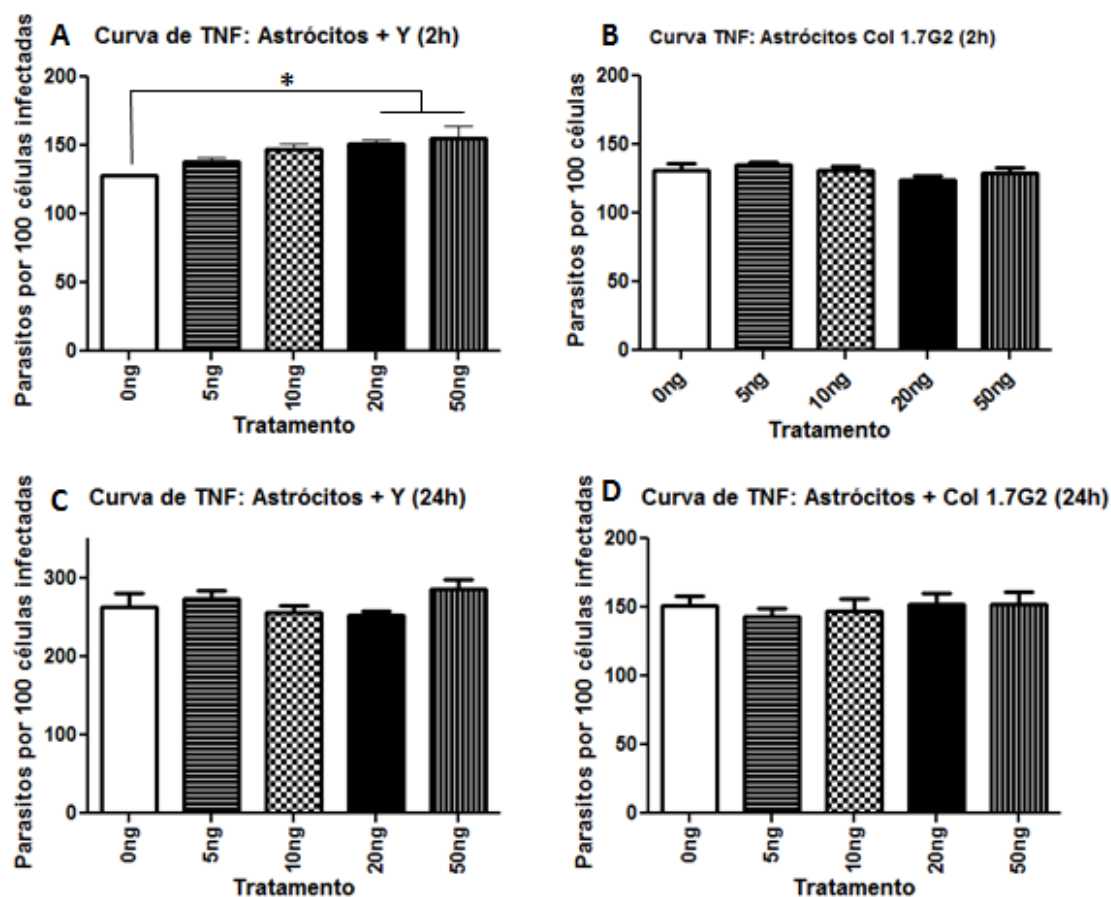


Figura 10. Número de parasitos intracelulares em astrócitos infectados pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α . A: Duas horas após infecção com a cepa Y (n=6). B: Duas horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9). C: 24 horas após infecção com a cepa Y (n=6). D: 24 horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9).

* $p < 0,008$.

4.4. Determinação da concentração de TNF- α a ser utilizada na infecção de micróglia pela cepa Y e pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*

O tratamento das micróglia com 20ng e 50ng de TNF- α , por 6 horas demonstrou um aumento significativo sobre a porcentagem (%) de células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* 2 horas após a infecção em relação aos tratamentos com 0ng e 5ng/ml de TNF- α (Figura 11 A). Após 24 horas, as micróglia tratadas com 20ng e 50ng de TNF- α apresentaram um aumento significativo sobre a porcentagem (%) de células infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* em relação aos outros grupos (Figura 11C). Micróglia infectadas pelo clone Col 1.7G2 não apresentaram diferença significativa

sobre a porcentagem de células infectadas em qualquer das doses de TNF- α testadas nos períodos de 2 e 24 horas de infecção (Figura 11B e D).

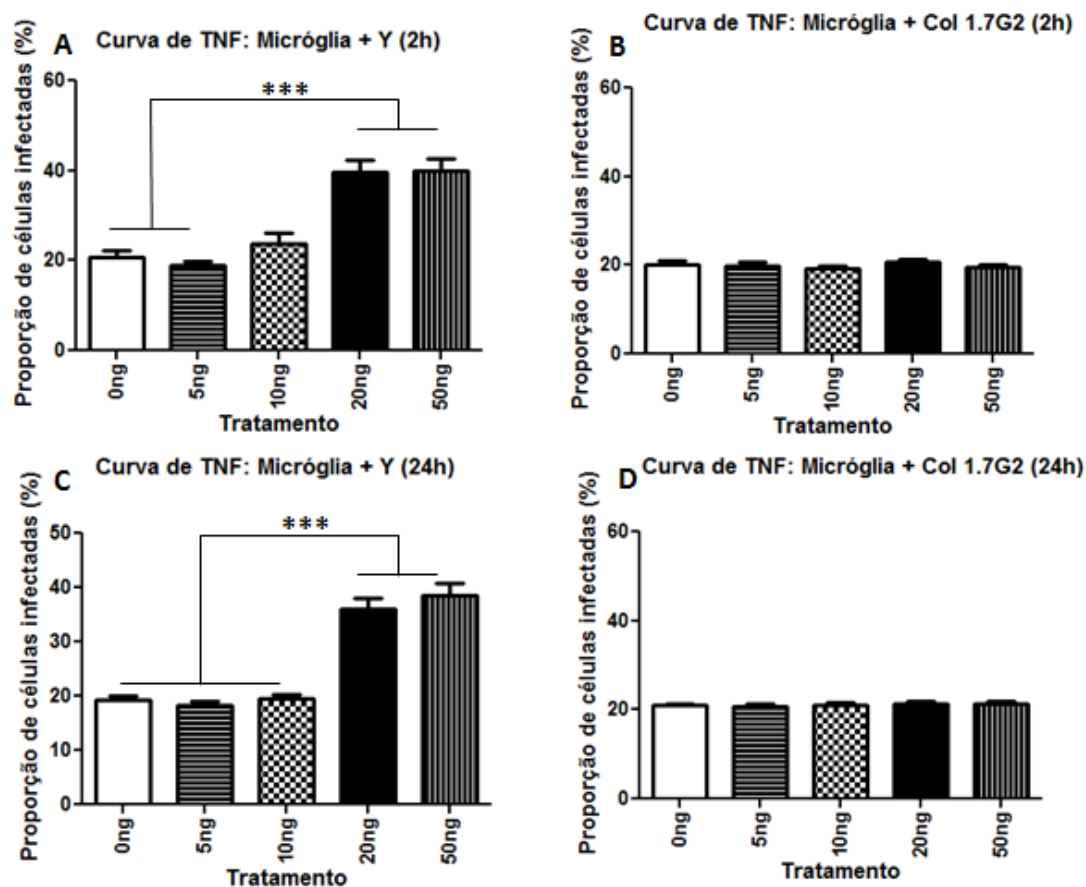


Figura 11. Percentagem de micróglias infectadas pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α . A: Duas horas após infecção com cepa Y (n=9). B: Duas horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9). C: 24 horas após infecção pela cepa Y (n=9). D: 24 horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9). *** p<0,0001.

O número de parasitos por 100 células infectadas após o tratamento de micróglias com diferentes concentrações de TNF- α por 6 horas não alterou significativamente em qualquer das concentrações utilizadas, na infecção com a cepa Y ou com o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*, nos dois períodos de tempo analisados. (Figura 12).

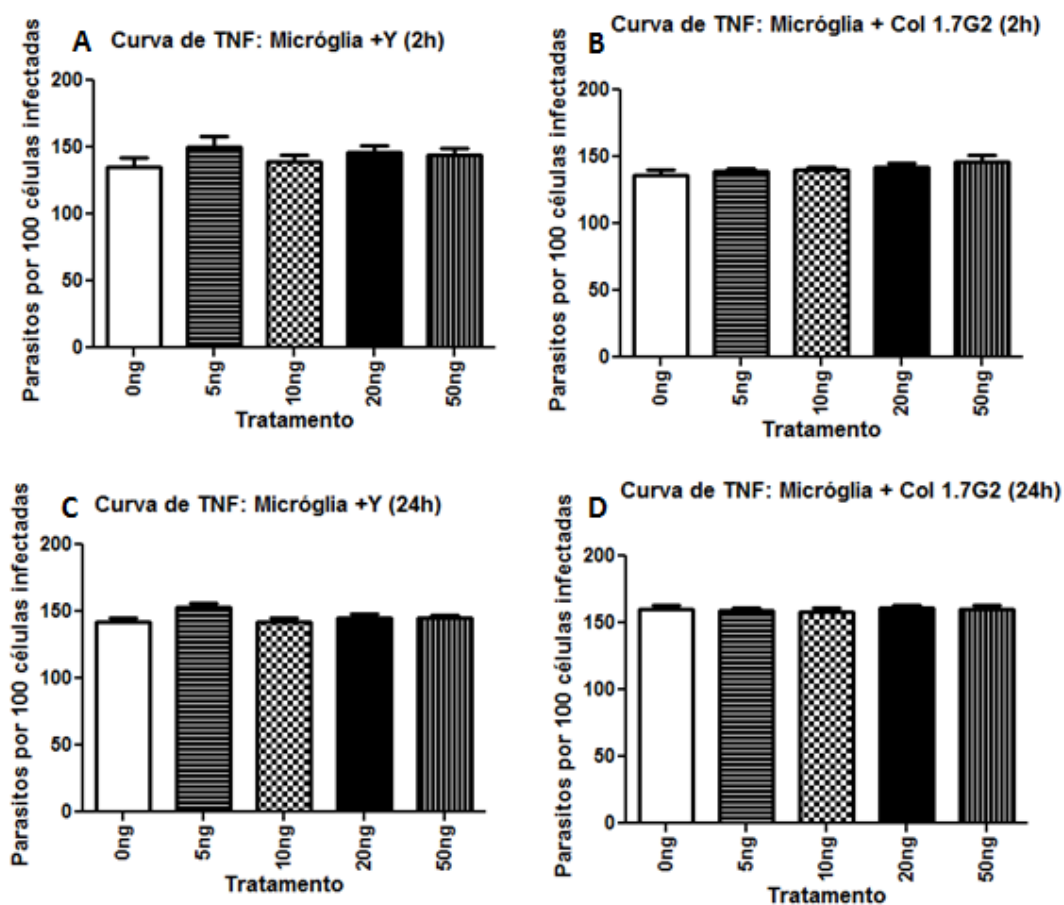


Figura 12. Número de parasitos intracelulares em micrógliia infectada pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* após tratamento por 6 horas com diferentes concentrações de TNF- α . A: Duas horas após infecção com a cepa Y (n=9). B: Duas horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9). C: 24 horas após infecção com a cepa Y (n=9). D: 24 horas após infecção com o clone Col 1.7G2 (n=9). * $p < 0,008$.

4.5. Efeito do tratamento com 20ng de TNF- α sobre a infecção de astrócitos com a cepa Y e o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*

Após os resultados referentes à curva de concentração de TNF- α , optou-se pela dose de 20 ng/ml de TNF- α no estudo dos efeitos dessa citocina sobre a infecção de astrócitos e de micróglias com a cepa Y ou com o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*

Astrócitos tratados com 20ng/ml de TNF- α , por 6 horas, apresentaram um aumento significativo no percentual de células infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* em relação às células não tratadas, nos períodos de 2 horas e 24 horas de infecção (Figuras

13A, 14 e 15). O mesmo efeito não foi observado na infecção de astrócitos pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* (Figuras 13B, 14 e 15).

Em relação ao número de parasitos por cem células infectadas, os astrócitos tratados com 20ng/ml de TNF- α apresentaram um aumento significativo somente no tempo de 2 horas de infecção com a cepa Y *T. cruzi* (Figuras 13C, 14 e 15). Astrócitos infectados pelo clone Col 1.7G2 não apresentaram diferença significativa em relação ao número de parasitos por cem células infectadas (Figuras 13D, 14 e 15).

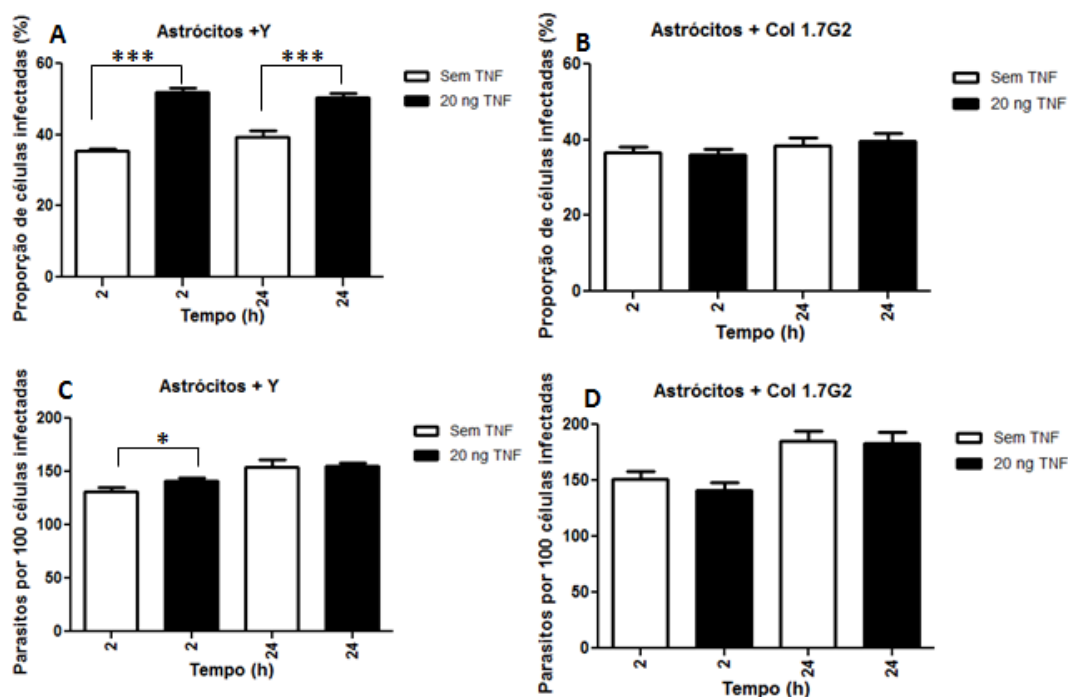
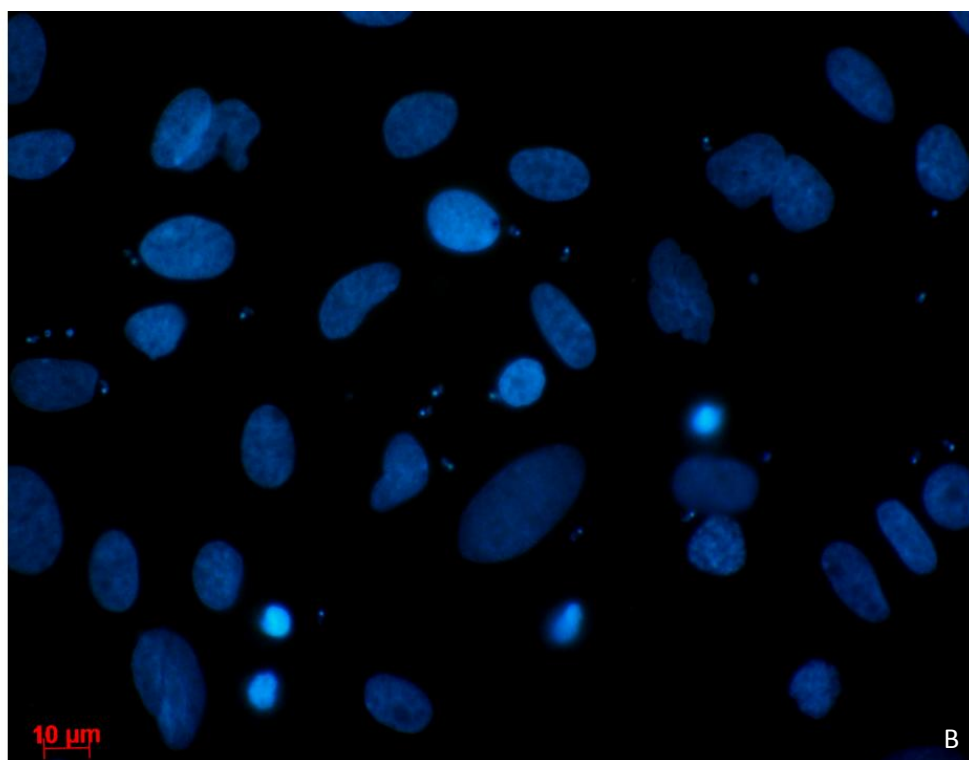
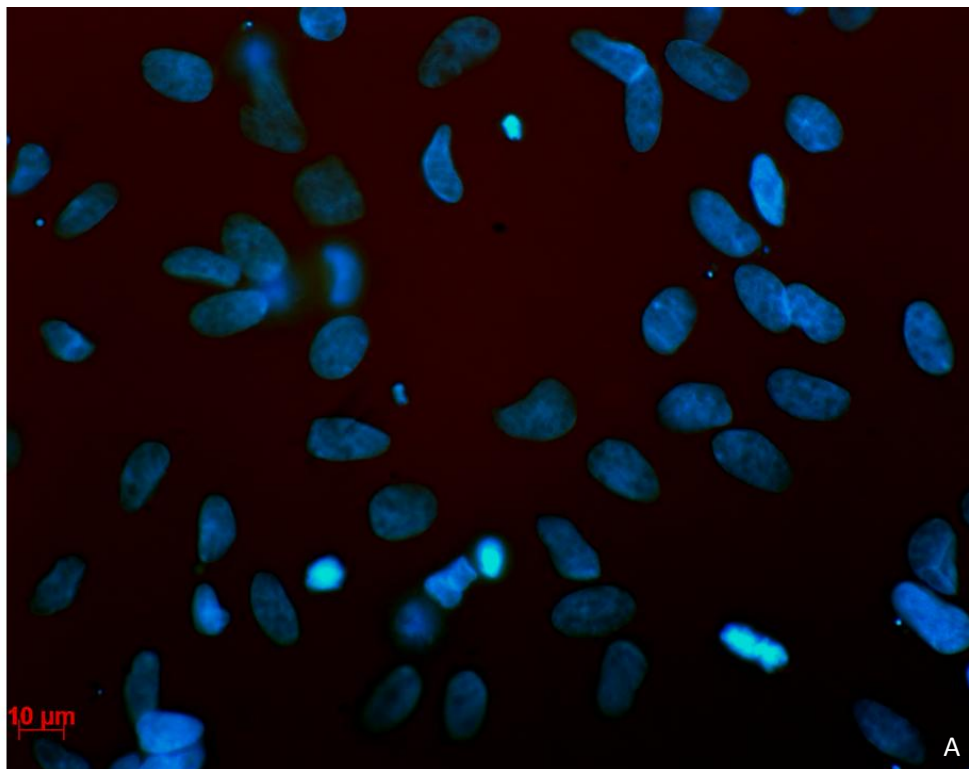


Figura 13. Efeito do tratamento com 20ng de TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de astrócitos pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*. A: Percentagem de astrócitos infectados pela cepa Y (n=12). B: Percentagem de astrócitos infectados pelo clone Col 1.7G2 (n=12). C: Parasitos por cem células infectadas pela cepa Y (n=12). D: Parasitos por cem células infectadas pelo clone Col 1.7G2 (n=12). * p<0,03; *** p<0,005.



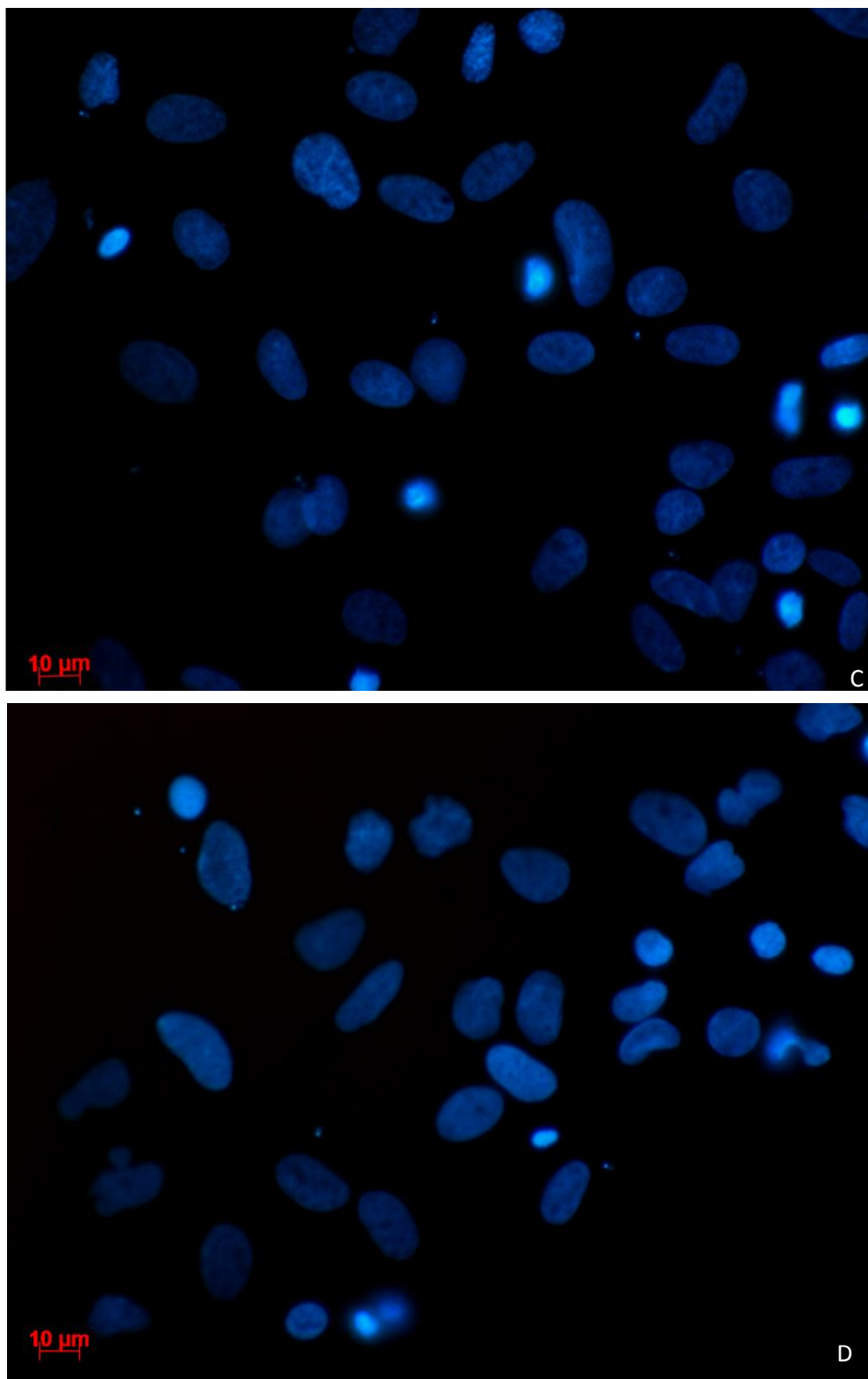
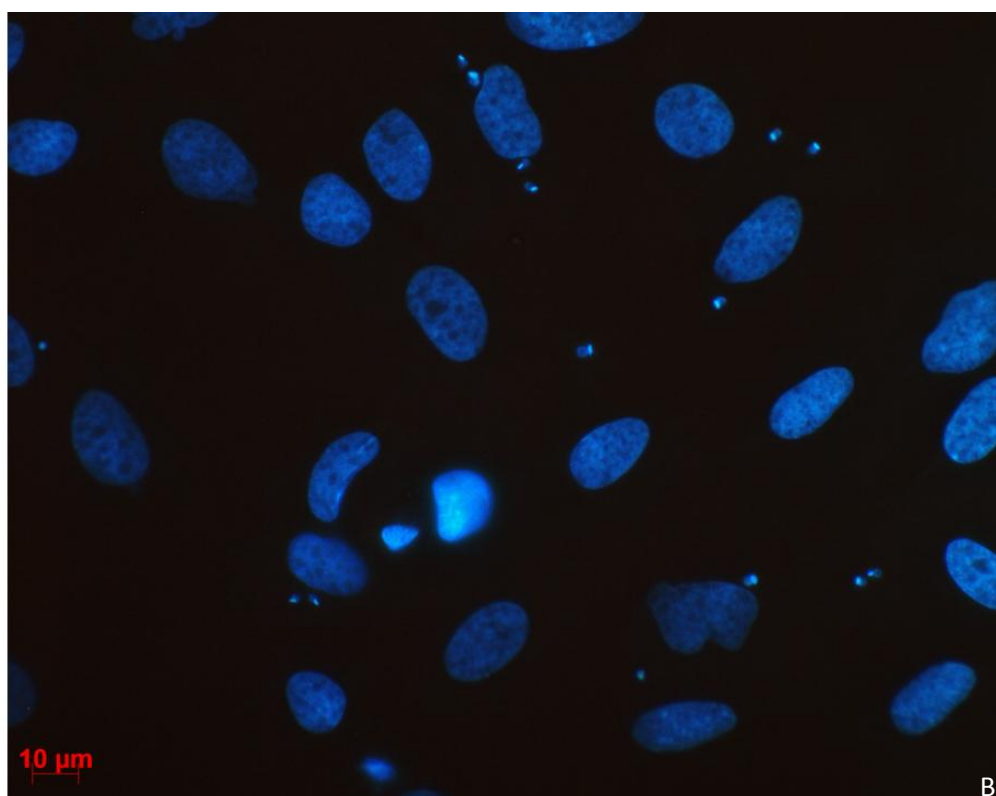
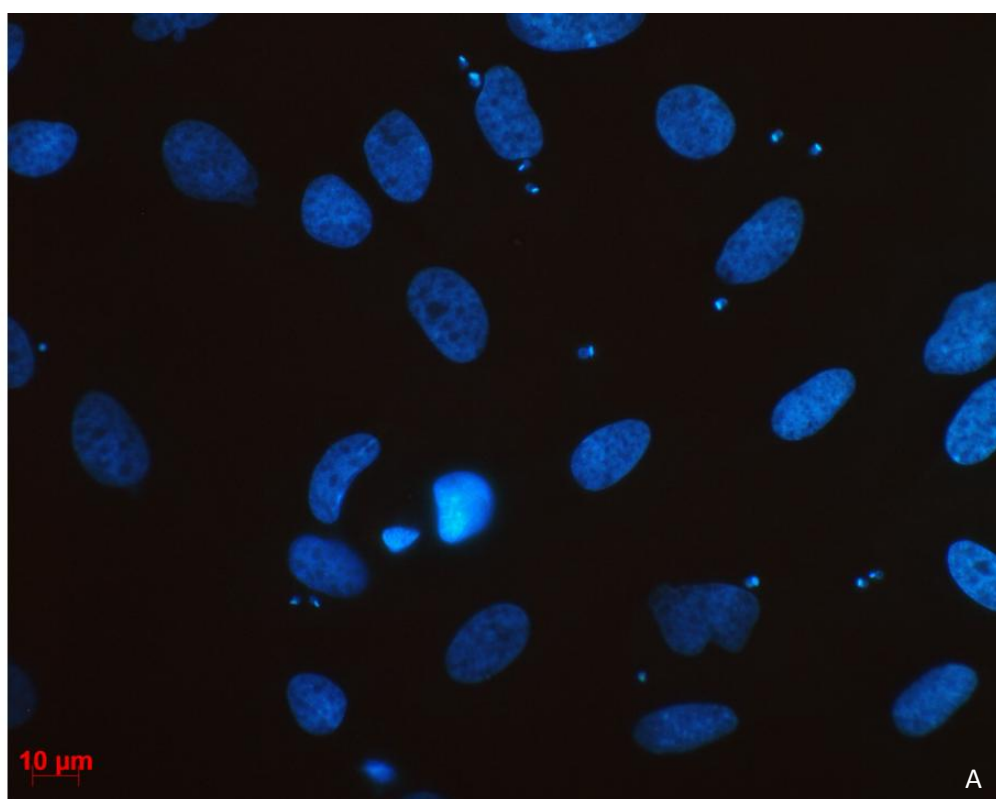


Figura 14. Efeito do tratamento com TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de astrócitos pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* no tempo de 2 horas. A: Astrócitos infectados pela cepa Y com 0ng de TNF- α . B: Astrócitos infectados pela cepa Y com 20ng de TNF- α . C: Astrócitos infectados pelo clone Col 1.7G2 com 0ng de TNF- α . D: Astrócitos infectados pelo clone Col 1.7G2 com 20ng de TNF- α .



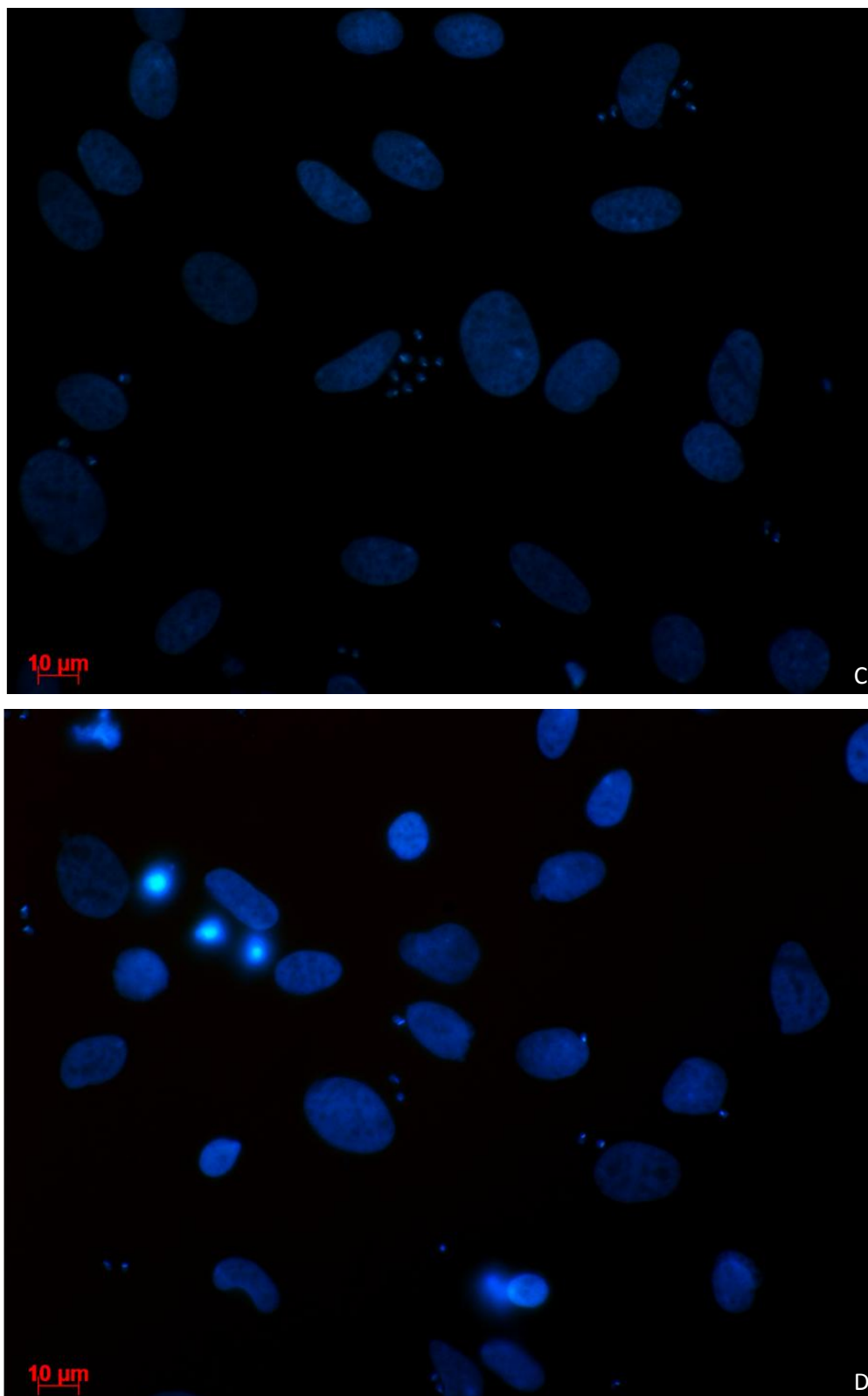


Figura 15. Efeito do tratamento com TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de astrócitos pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* no tempo de 24 horas. A: Astrócitos infectados pela cepa Y com 0ng de TNF- α . B: Astrócitos infectados pela cepa Y com 20ng de TNF- α . C: Astrócitos infectados pelo clone Col 1.7G2 com 0ng de TNF- α . D: Astrócitos infectados pelo clone Col 1.7G2 com 20ng de TNF- α .

4.6. Efeito do tratamento com 20ng de TNF- α sobre a infecção de micróglia com a cepa Y ou com o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*

Assim como os resultados obtidos para astrócitos, micróglia tratada com 20ng/ml de TNF- α por 6 horas apresentou um aumento significativo no percentual de células infectadas pela cepa Y de *T. cruzi* em relação às células não tratadas, nos períodos de 2 horas e 24 horas de infecção (Figuras 16A, 17 e 18). O mesmo efeito não foi observado na infecção de micróglia pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* (Figuras 16B, 17 e 18).

Em relação ao número de parasitos por cem células infectadas, não se observou diferença significativa tanto na infecção com a cepa Y quanto pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* (Figuras 16C e D, 17 e 18).

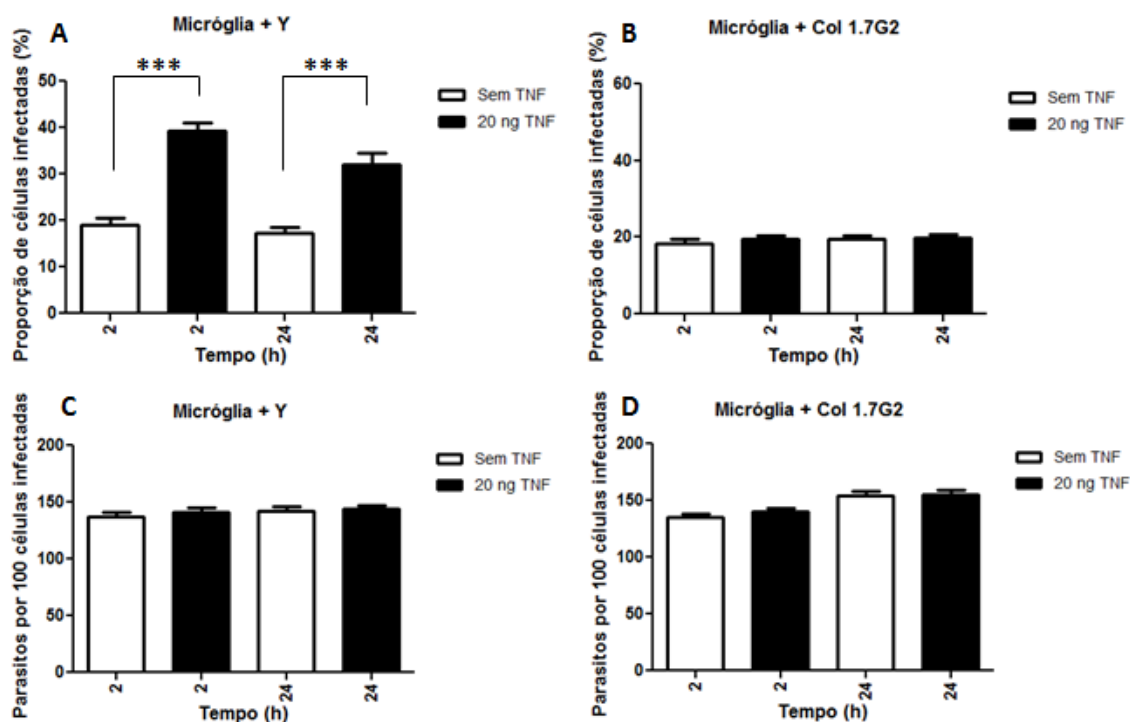
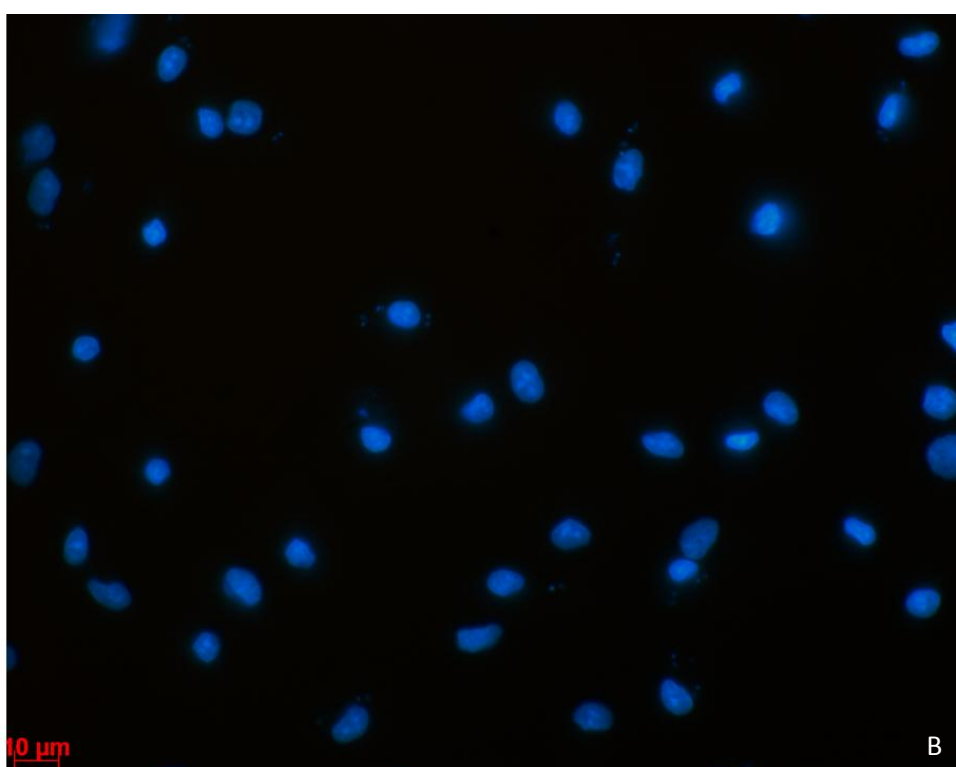
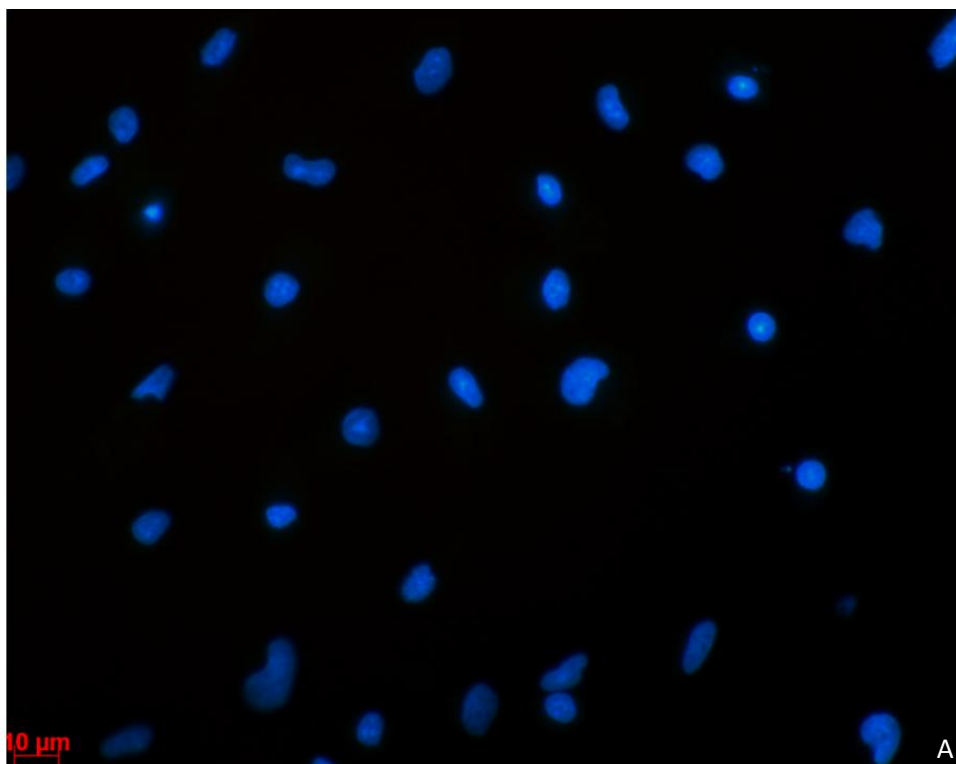


Figura 16. Efeito do tratamento com 20ng de TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de micróglia pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*. A: Percentagem de micróglia infectadas pela cepa Y (n=12). B: Percentagem de micróglia infectadas pelo clone Col 1.7G2 (n=15). C: Parasitos por cem células infectadas pela cepa Y (n=12). D: Parasitos por cem células infectadas pelo clone Col 1.7G2 (n=15). *** p<0,005.



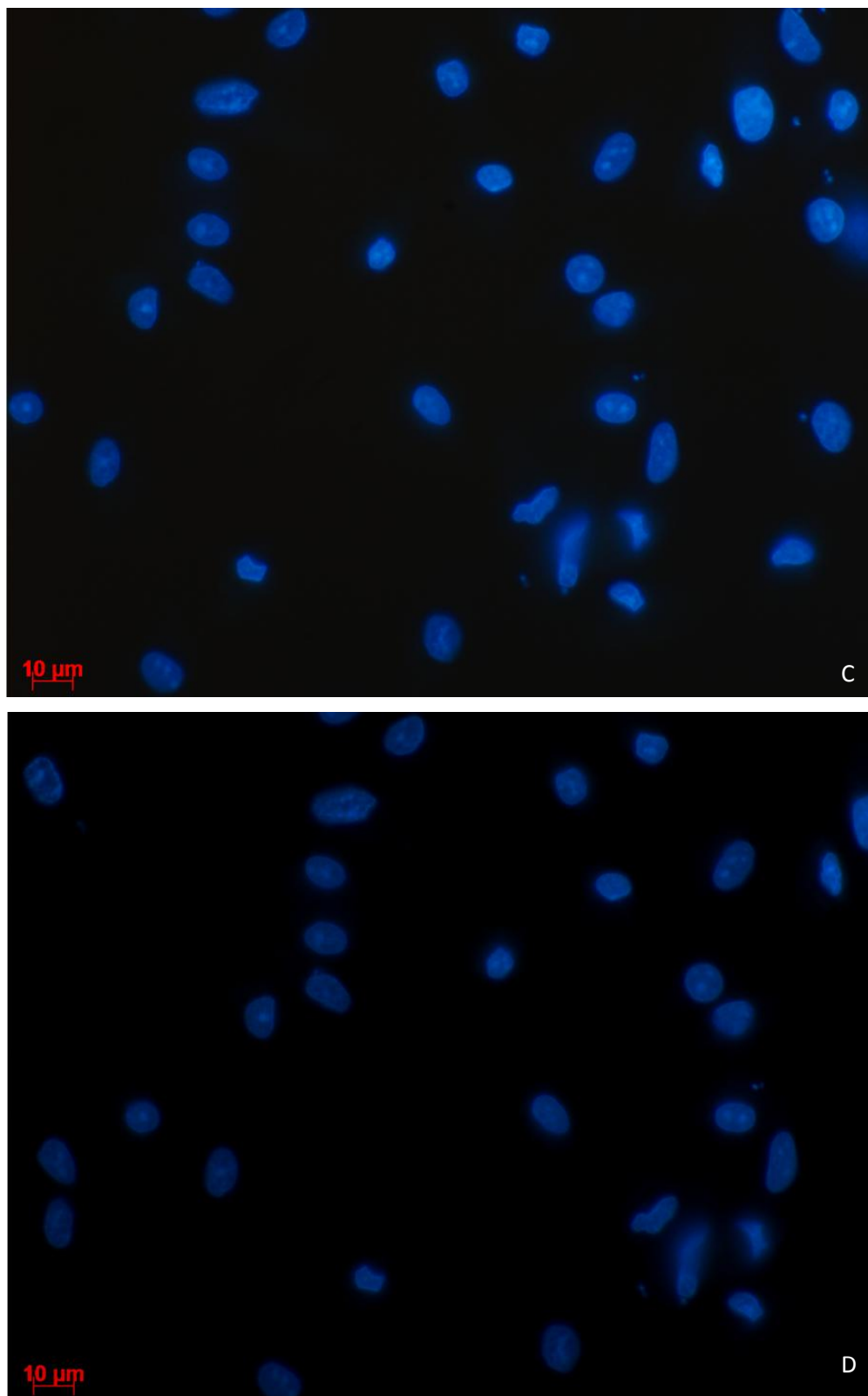
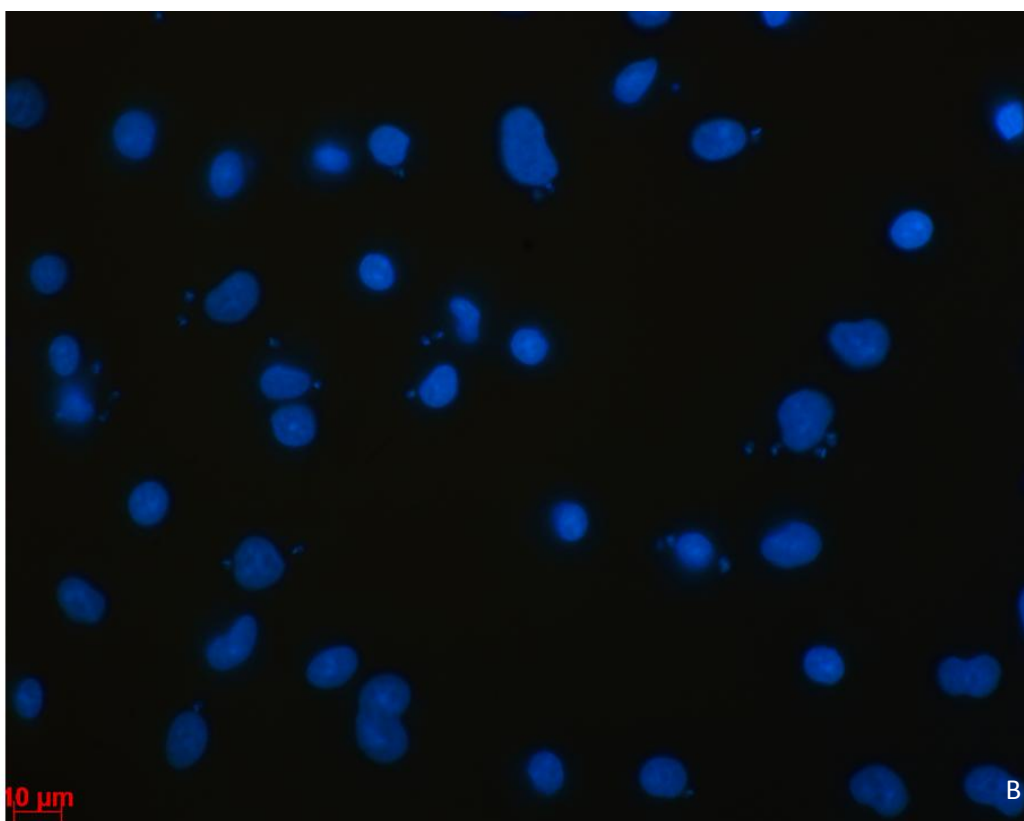
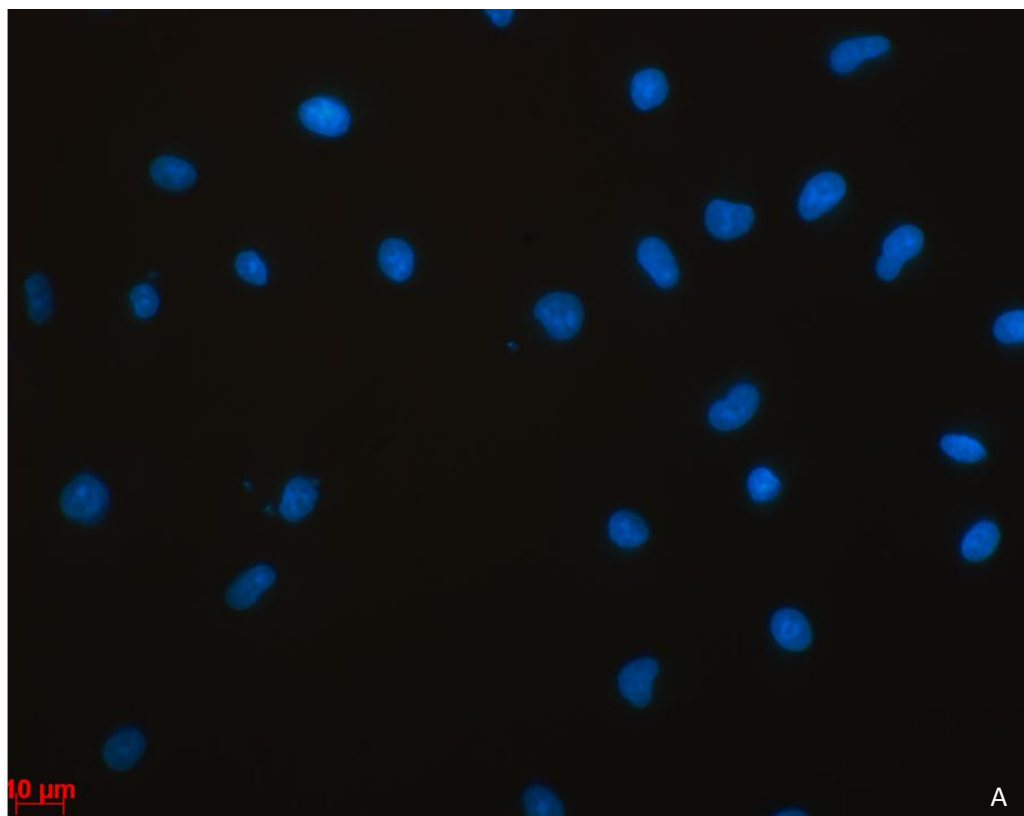


Figura 17. Efeito do tratamento com TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de micróglia pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* no tempo de 2 horas. A: Micróglia infectada pela cepa Y com 0ng de TNF- α . B: Micróglia infectada pela cepa Y com 20ng de TNF- α . C: Micróglia infectada pelo clone Col 1.7G2 com 0ng de TNF- α . D: Micróglia infectada pelo clone Col 1.7G2 com 20ng de TNF- α .



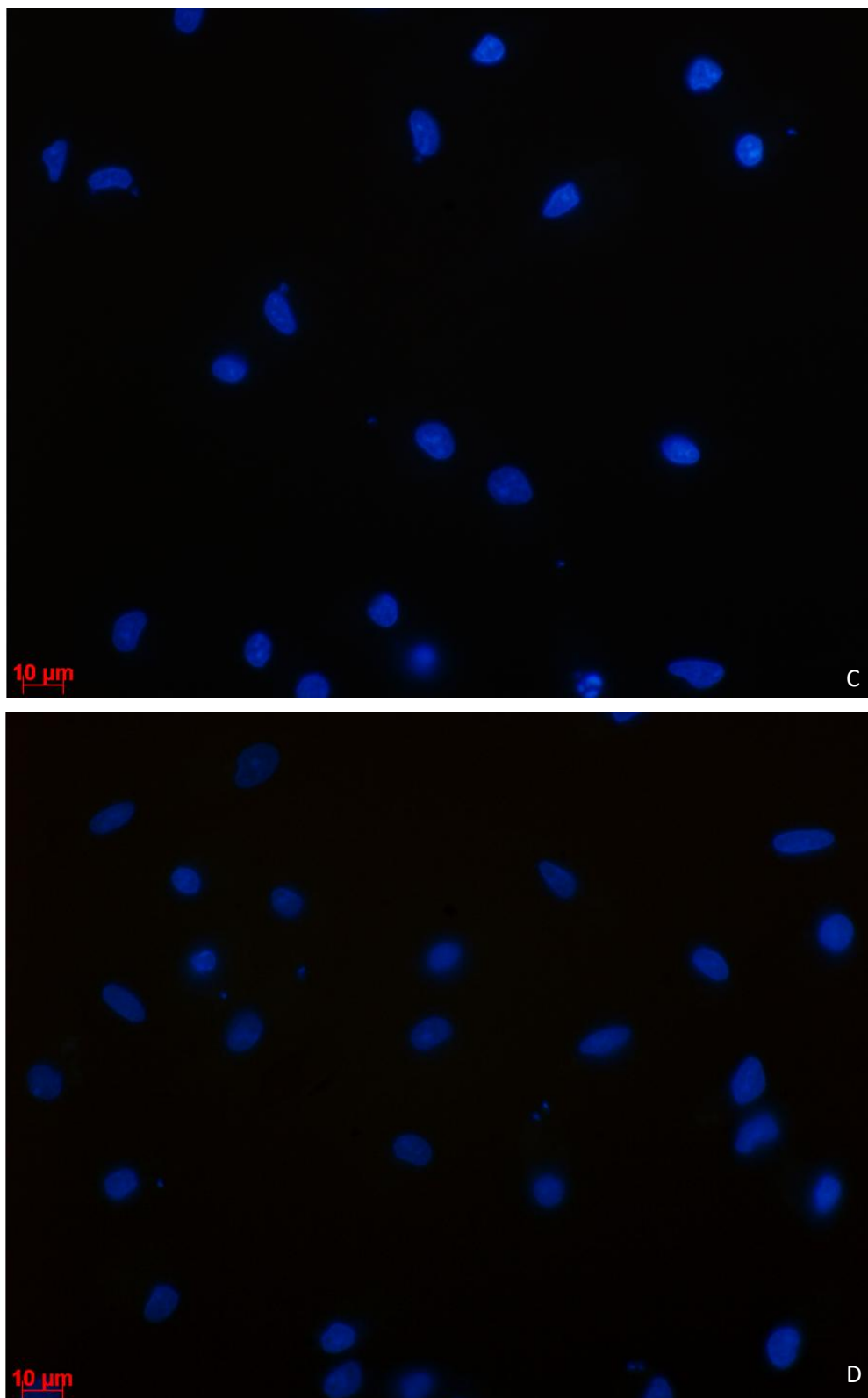


Figura 18. Efeito do tratamento com TNF- α , por 6 horas, sobre a infecção de micróglias pela cepa Y ou pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* no tempo de 24 horas. A: Micróglias infectadas pela cepa Y com 0ng de TNF- α . B: Micróglias infectadas pela cepa Y com 20ng de TNF- α . C: Micróglias infectadas pelo clone Col 1.7G2 com 0ng de TNF- α . D: Micróglias infectadas pelo clone Col 1.7G2 com 20ng de TNF- α .

5. Discussão

Em nosso trabalho, a infecção de astrócitos de cultivo primário na proporção de 10 parasitos/célula resultou em percentual de células infectadas em torno de 80% logo após 2 horas de infecção, muito superior ao relatado por Vargas-Zambrano e colaboradores (2013), onde a porcentagem de células infectadas atingiu 30% no segundo dia após a infecção, 50% no terceiro e 90% no sexto dia e a análise durou até o sexto dia pós-infecção e a porcentagem foi aumentando ao longo do tempo, assim como o número de amastigotas por célula. Por volta do quarto dia após a infecção, amastigotas transformados em tripomastigotas foram liberados para o meio de cultura causando um significativo aumento na porcentagem de células infectadas no quinto dia pós-infecção, em contraste com os nossos resultados, onde os astrócitos já começaram a se romper no período de 24 horas de infecção. Essas diferenças podem estar relacionadas tanto com a linhagem de astrócitos utilizados (astrocitoma e cultivo primário), quanto à população de *T. cruzi*, pertencentes a DTU's diferentes (TcI e TcII). Em relação à parasitos por células infectadas, nossos resultados são semelhantes os obtidos por aqueles autores.

Troyo & Chinchilla (2003) analisaram a multiplicação de *T. cruzi* em astrócitos isolados de camundongo, rato e hamster e observaram que o número de amastigotas em astrócitos de rato é menor que naqueles isolados de hamster e camundongo. De acordo com esses autores, estudos *in vitro* sobre a multiplicação intracelular de *T. cruzi* devem considerar as diferenças que podem existir entre células-alvo de origem distinta, nesse caso, de hospedeiros distintos.

Estudo realizado por Silva e colaboradores (2015) sobre a infecção de cultura primária de astrócitos de camundongo pela cepa Colombiana de *T. cruzi* (TcI) mostrou porcentagem de células infectadas em torno de 30% após 4h da infecção e de 80% após 24h. Para infecção dessas células, os autores utilizaram a proporção de 10 parasitos/célula. Diferentemente dos nossos resultados, ocorreu um aumento da porcentagem de células infectadas nos períodos de 4 e 24 horas de infecção. Ao utilizarem a proporção de 1:1 para a infecção de astrócitos, o percentual de células infectadas alcançou 10% , 4 horas após a infecção, e 50% após 24 horas. Os astrócitos apresentaram em torno de 200 parasitos/100 células após 4 horas de infecção, resultado semelhante ao nosso nessa proporção de 10:1, porém após 24 horas o número de parasitos/100 células foi de 600, bem superior ao nosso resultado. Já na proporção de

1:1 o número de parasitos/100 células foi menor que 100 após 4 horas e 200 após 24 horas.

Da Mata e colaboradores (2000), ao analisarem, em ratos lactentes, a infecção do SNC pela cepa Y ou pelo clone CL-Brener, observaram parasitismo em regiões do cérebro e no córtex cerebelar. Esses autores mostraram que os astrócitos são o principal alvo do *T. cruzi* no SNC.

Silva e colaboradores (2015) também avaliaram a infecção do SNC, em ratos, pela cepa Colombiana de *T. cruzi* I e observaram que 80% dos amastigotas no SNC estavam em astrócitos distribuídos ao longo do parênquima cerebral, tanto na fase crônica, quanto na fase aguda. Nossos resultados, obtidos *in vitro*, mostraram que a invasão de astrócitos infectados por *T. cruzi* é maior que em micróglia, confirmando os astrócitos como alvo preferencial do *T. cruzi*. Em relação aos efeitos do tratamento com 20ng de TNF- α , nossos resultados mostram que essa citocina aumenta a percentagem de astrócitos infetados pela cepa Y de *T. cruzi*, nos períodos de 2 e 24 horas de infecção. O mesmo efeito não foi observado na infecção de astrócitos pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*. Já em relação à taxa de infecção com cepa Y, o tratamento prévio com TNF- α resultou em aumento significativo de parasitos intracelulares no período de 2 horas de infecção. Esse resultado pode indicar que o TNF- α favorece a adesão e invasão de tripomastigotas nesse tipo celular.

O tratamento, *in vitro*, de astrócitos com 10ng de IFN- γ pelo grupo de Silva (2015) aumentou a susceptibilidade à infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* e promoveu a proliferação de amastigotas. Entretanto, quando os astrócitos foram tratados com anticorpo anti- TNF- α antes do tratamento com o IFN- γ , esse aumento na infecção não foi observado, indicando que esse efeito do tratamento com o IFN- γ se deve a indução da produção de TNF- α pelo mesmo. Esses resultados sobre os efeitos indiretos do IFN- γ , atuando sobre a estimulação da produção de TNF- α são semelhantes aos nossos resultados, onde o tratamento dos astrócitos com TNF- α demonstrou um aumento significativo sobre a porcentagem de células infectadas em relação aos astrócitos não tratados, nos tempos de 2 e de 24 horas após a infecção. Em relação ao número de parasitos/100 células infectadas, apenas o tempo de 2 horas após a infecção demonstrou um aumento significativo em relação ao controle. Entretanto, vale ressaltar que nossos resultados foram obtidos com a cepa Y de *T. cruzi*.

Quando avaliamos a infecção de astrócitos pelo clone Col 1.7G2 de *T. cruzi*, não encontramos diferença significativa em relação ao tratamento com o TNF- α , mesmo com concentração de 100ng/ml, seja em relação à porcentagem de células infectadas seja em relação ao número de parasitos intracelulares. Até onde conseguimos avaliar, não há outros dados na literatura sobre infecção de astrócitos com o clone Col 1.7G2.

Nossos resultados obtidos com a infecção de micróglia com a cepa Y mostram que o tratamento com TNF- α não altera a taxa de infecção desse tipo celular. Entretanto, a porcentagem de células microgliais infectadas com a cepa Y de *T. cruzi*, nos tempos de 2 e de 24 horas de infecção, aumenta após tratamento com essa citocina. Até onde conseguimos pesquisar na literatura, nosso trabalho é o primeiro a estudar a infecção, in vitro, de micróglia por *T. cruzi*. Assim como os resultados obtidos com o clone Col 1.7G2 de *T. cruzi* em astrócitos, micróglia também não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento com o TNF- α , seja em relação à porcentagem de células infectadas seja em relação ao número de parasitos intracelulares.

Nossos resultados sugerem que tanto astrócitos quanto micróglia quando submetidos ao tratamento com TNF- α tornam-se mais susceptíveis a infecção pela cepa Y de *T. cruzi*, pois a porcentagem de células infectadas aumenta significativamente em relação às células não tratadas. Entretanto, a invasão desses tipos celulares por tripomastigotas parece ser afetada diferentemente por essa citocina.

Estudo anteriormente realizado no Laboratório Profa. Conceição Machado, mostrou que o TNF- α também facilita a entrada de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em células LLC-MK2 e HEK293T (Pinto e colaboradores, 2011), mediante ativação do fator de transcrição NF κ -B. De modo interessante, Hall e colaboradores (2000) mostraram que em células musculares cardíacas, um dos tipos celulares preferencialmente parasitados pelo *T. cruzi*, não ocorre ativação de NF κ -B. Esse fator de transcrição regula a expressão de genes relacionados à secreção de mediadores da resposta inflamatória. Seria interessante avaliar se a infecção de astrócitos e de micróglia por distintas populações de *T. cruzi* resultaria em ativação ou não desse fator de transcrição.

No caso específico do SNC, há uma relação íntima entre astrócitos e a manutenção da BHE. TNF- α é capaz de induzir a perda da integridade dessa barreira. Consideramos pertinente avaliar os efeitos do TNF sobre modelos in vitro de BHE,

atualmente considerados excelentes ferramentas para estudar mecanismos envolvidos em doenças que afetam o SNC.

6. Conclusões

Nossos resultados permitem concluir que:

- i) Astrócitos e micróglia exibem comportamento distinto em relação ao percentual de células infectadas, *in vitro*, pelo *T. cruzi*;
- ii) O tratamento prévio com TNF- α aumenta a proporção de astrócitos e micróglia infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*;
- iii) O tratamento prévio com TNF- α não afeta a infecção de astrócitos e micróglia pelo clone Col 1.7 G2.

7. Referências

- Abbott, N. J. (2002). Astrocyte – endothelial interactions and blood – brain barrier permeability *. *Journal Anatomy*, 629–638.
- Aloisi, F. (2001). Immune Function of Microglia. *Glia*, 179(February), 165–179. doi:10.1002/glia.1106
- Andrade, J. P., Marin-Neto, J. A., Paola, A. A. V., Vilas-Boas, F., Oliveira, G. M. M., Bacal, F., ... Dias, J. C. P. (2011). I Latin A merican G uideline for the Diagnosis and Treatment of Chagas' Heart Disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 97(2 supl.3), 1–148.
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(9), 1135–43. doi:10.1084/jem.20041408
- Andrade, Z. A. (1991). Pathogenesis of Chagas ' disease. *Research in Immunology*, 142(2), 126–129.
- Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L., & Griffiths, G. (1990). A T. cruzi-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*, 61(7), 1277–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2194668>
- Barrias, E. S., de Carvalho, T. M. U., & De Souza, W. (2013). *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers in Immunology*, 4(August), 186. doi:10.3389/fimmu.2013.00186
- Basso, B. (2013). Modulation of immune response in experimental Chagas disease. *World Journal of Experimental Medicine*, 3(1), 1–10. doi:10.5493/wjem.v3.i1.World
- Bernstein, J.J; Getz, R; Jefferson, M; Kelemen, M. Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of rat spinal cord. *Brain Research*, 327: 135-141, 1985.
- Bombeiro, A. L., Gonçalves, L. A., Penha-Gonçalves, C., Marinho, C. R. F., D'Império Lima, M. R., Chadi, G., & Álvarez, J. M. (2012). IL-12p40 deficiency leads to uncontrolled *Trypanosoma cruzi* dissemination in the spinal cord resulting in neuronal death and motor dysfunction. *PloS One*, 7(11), e49022. doi:10.1371/journal.pone.0049022
- Brito, M. A; Cardoso, F. L; Brites, D. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews*, 64: 328-363, 2010.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, 347–378.

- Brener, Z. (1997). *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. *Scielo Books*, 24–31.
- Camargo, M. M., Andrade, C., Almeida, C., & Travassos, L. R. (1997). Glycoconjugates Isolated from. *The Journal of Immunology*, 159, 6131–6139.
- Cardoso, F. L., Brites, D., & Brito, M. A. (2010). Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews*, 64(2), 328–63. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.05.003
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159–218. doi:10.1590/S0074-02761909000200008
- Coura, J. R. (2013). Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(8), 962–7. doi:10.1590/0074-0276130565
- Da Mata, J. R., Camargos, E. R. S., Chiari, E., & Machado, C. R. S. (2000). *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system : Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism. *Brain Research Bulletin*, 53(2), 153–162.
- De Souza, W., de Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010. doi:10.1155/2010/295394
- Dias, E. (1956). Observações sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sul-americanos. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 54(1), 115–124. doi:10.1590/S0074-02761956000100006
- Dias, J. C. P. (2006). Chagas disease : successes and challenges. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 22(June), 2020 –2021.
- Dias, J. C. P. (2009). Elimination of Chagas disease transmission : perspectives. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 41–45.
- Dias, J. C. P., Neto, V. A., & Luna, E. J. de A. (2011). Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(3), 375–379. doi:10.1590/S0037-86822011005000032.Mecanismos
- Dong, Y., & Benveniste, E. N. (2001). Immune Function of Astrocytes. *Glia*, 190(June), 180–190. doi:10.1002/glia.1107
- Giulian, D., & Baker, T. J. (1985). Peptides Released by Ameboid Microglia Regulate Astroglial Proliferation. *The Journal of Cell Biology*, 101(December), 2411–2415.

- Golgher, D., & Gazzinelli, R. T. (2004). Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimmunity*, 37(5), 399–409. doi:10.1080/08916930410001713115
- Guangwen Ren, Xin Zhao, Liying Zhang, Jimin Zhang, A. L., & Ling, W. (2010). Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion. *Journal of Immunology*, 184(5), 2321–2328. doi:10.4049/jimmunol.0902023.Inflammatory
- Lages-silva, E., Ramirez, L. E., Silva-vergara, M. L., & Chiari, E. (2002). Chagasic Meningoencephalitis in a Patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome : Diagnosis , Follow-Up , and Genetic Characterization of Trypanosoma cruzi. *Clinical Infectious Diseases*, 34.
- Laranja, F. S., Dias, E., Nobrega, G., & Miranda, A. (1956). Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation*, 14(6), 1035–1060. doi:10.1161/01.CIR.14.6.1035
- Ley, B. Y. V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., & Andrews, N. W. (1990). The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the ph of acidic compartments. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(February).
- Li, J; Ding, Y.H; Rafols, J.A; Lai, Q. et al. Increased astrocytes proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience Letters*, 386: 160-164, 2005.
- Magdesian, M. H., Giordano, R., Ulrich, H., Juliano, M. a, Juliano, L., Schumacher, R. I., ... Alves, M. J. (2001). Infection by Trypanosoma cruzi. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19382–9. doi:10.1074/jbc.M011474200
- Masocha, W., & Kristensson, K. (2012). Passage of parasites across the blood-brain barrier. *Virulence*, 3(2), 202–212.
- Paul M Carvey, Bill Hendey, A. J. M. (2009). The Blood Brain Barrier in Neurodegenerative Disease: A. *Journal. Neurochemistry*, 111(2), 291–314. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06319.x.The
- Pinto, A. M. T., Sales, P. C. M., Camargos, E. R. S., & Silva, A. M. (2011). Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF-κB activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by Trypanosoma cruzi. *Cellular Microbiology*, 13(10), 1518–29. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01636.x
- Pittella, J. E. H. (1993). Central nervous system involvement in Chagas' disease: an updating. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35(2), 111–116. doi:10.1590/S0036-46651993000200001
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Chagas Disease*, 1(September).

- Rocha Rodrigues, D. B., dos Reis, M. A., Romano, A., Pereira, S. A. D. L., Teixeira, V. D. P. A., Tostes, S., & Rodrigues, V. (2012). In situ expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 361730. doi:10.1155/2012/361730
- Sathler-Avelar, R., Vitelli-Avelar, D. M., Teixeira-Carvalho, A., & Martins-Filho, O. A. (2009). Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease : what must be understood ? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 246–251.
- Schenkman, S., Andrews, N. W., Nussenzweig, V., & Robbins, E. S. (1988). Trypanosoma cruzi Invade a Mammalian Epithelial Cell in a Polarized Manner. *Cell*, 55, 157–165.
- Schmunis, G. a, & Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1-2), 14–21. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003
- Seregi, A., Keller, M., Jackisch, R., & Hertting, G. (1984). Comparison of the synthesizing capacity in homogenates from primary neuronal and astroglial cell cultures. *Biochemical Pharmacology*, 33(20), 3315–3318.
- Silva, G. C., Nagib, P. R. A., Chiari, E., Rooijen, N. Van, Machado, C. R. S., & Camargos, E. R. S. (2004). Peripheral macrophage depletion reduces central nervous system parasitism and damage in Trypanosoma cruzi -infected suckling rats. *Journal of Neuroimmunology*, 149, 50–58. doi:10.1016/j.jneuroim.2003.12.004
- Silva, R. R., Mariante, R. M., Silva, A. A., dos Santos, A. L. B., Roffê, E., Santiago, H., ... Lannes-Vieira, J. (2015). Interferon-Gamma Promotes Infection of Astrocytes by Trypanosoma cruzi. *Plos One*, 10(2), 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0118600
- Silveira, A. C., & Dias, J. C. P. (2011). O controle da transmissão vetorial The control of vectorial transmission, 52–63.
- Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V, Simon, D., Morris, S. a, Weiss, L. M., & Wittner, M. (1992). Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), 400–19. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=358257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Troyo, A., & Chinchilla, M. (2003). In vitro multiplication of Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi in mouse, rat, and hamster astrocytes. *Revista de Biología Tropical*, (51.3-4), 639–644.
- Van Buul, J. D., van Rijssel, J., van Alphen, F. P. J., Hoogenboezem, M., Tol, S., Hoeben, K. a, ... Hordijk, P. L. (2010). Inside-out regulation of ICAM-1 dynamics in TNF-alpha-activated endothelium. *PloS One*, 5(6), e11336. doi:10.1371/journal.pone.0011336

- Vargas-Zambrano, J. C., Lasso, P., Cuellar, A., Puerta, C. J., & González, J. M. (2013). A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(April), 212–219.
- Villela, E., & Villela, E. (1932). Elementos do sistema nervoso central parasitados pelo *Trypanosoma cruzi*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 26(1), 77–79. doi:10.1590/S0074-02761932000100004
- Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E., & Satoskar, A. R. (2014). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 71(7), 1245–63. doi:10.1007/s00018-013-1491-1
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., & Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(4), 842–57. doi:10.1016/j.bbamem.2008.10.022
- WHO. (2002). Control of Chagas disease. *World Health Organization: Technical Report Series*, 905.
- Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 78, 87–111. doi:S0001-37652006000100010 [pii]\n/S0001-37652006000100010
- Zingales, B. (2011). *Trypanosoma cruzi* : um parasita , dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas ? *Revista Da Biologia*, 44–48.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., & Guhl, F. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(November), 1051–1054.