

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Beatriz Maria da Silva Leite

**ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )  
E SEUS RECEPTORES NA INFECÇÃO DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS  
HUMANAS POR FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Belo Horizonte

2022

Beatriz Maria da Silva Leite

**Associação da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e seus receptores na  
infecção de células placentárias humanas por formas tripomastigotas de *Trypanosoma  
cruzi***

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em parasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra

Coorientadora: Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães

Belo Horizonte

2022

043 Leite, Beatriz Maria da Silva.

Associação da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e seus receptores na infecção de células placentárias humanas por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* [manuscrito] / Beatriz Maria da Silva Leite. – 2022.

110 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra. Coorientadora: Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Doença de Chagas. 4. Troca Materno-Fetal. 5. Fatores de Necrose Tumoral. I. Dutra, Walderez Ornelas. II. Magalhães, Luísa Mourão Dias. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PARASITOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**DISSERTAÇÃO 442/11/2022**

**TÍTULO: " Associação da expressão do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e seus receptores na infecção de células placentárias humanas por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*"**

**ALUNA: BEATRIZ MARIA DA SILVA LEITE**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **vinte e três de setembro de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelas seguintes doutoras:

**Antônia Claudia Jacome da Câmara**

UFRN

**Cristiane Alves da Silva Menezes**

UFMG

**Luísa Mourão Dias Magalhães - Coorientadora**

UFMG

**Walderez Ornelas Dutra- Orientadora**

UFMG

Belo Horizonte, 23 de setembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Luisa Mourão Dias Magalhães, Usuário Externo**, em 18/10/2022, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Walderez Ornelas Dutra, Professora do Magistério Superior**, em 19/10/2022, às 07:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonia Claudia Jácome da Câmara, Usuária Externa**, em 20/10/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 21/10/2022, às 07:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1766419** e o código CRC **FF11AEAF**.

---

**Referência:** Processo nº 23072.255796/2022-10

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Walderez Ornelas Dutra, por ter aceitado me orientar e me acolhido em seu laboratório. Muito obrigada por tudo!

À minha coorientadora Dra. Luísa Mourão Dias Magalhães, por ter me ensinado tanto e estar sempre disponível quando eu precisei. Obrigada por tudo o que fez por mim!

À Dra. Carolina Cattoni Koh pela ajuda fundamental com experimentos de citometria e HE. Obrigada por todos os ensinamentos e pela dedicação nessa reta final!

À professora Eloísa Amália Vieira Ferro, por ter cedido a célula BeWo;

À professora Eliane Lages Silva, pela cepa 3253;

À professora Luciana de Oliveira Andrade, pela cepa Y;

Ao professor Ricardo Toshio Fujiwara, por ter aberto as portas do seu laboratório quando eu precisei;

À Sumara e Sibebe por toda a ajuda;

Aos professores do programa de pós-graduação em parasitologia pelos ensinamentos;

À toda a equipe do LABIC pela colaboração, cooperação e amizade nesses dois anos.

*“Droit devant soi on ne peut pas aller bien loin...”*

*(Antoine de Saint-Exupéry, *Le Petit Prince*, 1943.)*



## RESUMO

A doença de Chagas crônica é uma doença tropical negligenciada, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e endêmica na América Latina. As formas de transmissão incluem a vetorial, oral, transfusional e congênita. A transmissão congênita é a principal forma de transmissão em países não-endêmicos, mostrando um aumento do número de casos nesses países devido a migrações de mulheres em idade gestacional, vindas de países endêmicos. As drogas utilizadas no tratamento da doença de Chagas não são recomendadas para uso em grávidas, não havendo, no momento, maneira de impedir a transmissão congênita. A população de *T. cruzi* que infecta humanos é agrupada em *discrete typing units* (DTU), que vão de TcI a TcV, associados a diferentes características biológicas e clínicas, e à transmissão congênita. Regiões com predomínio de cepas do tipo TcII apresentam uma taxa de transmissão congênita mais baixa, enquanto regiões com predomínio de TcV apresentam uma taxa de transmissão mais alta. Estudos com a cepa 3253, pertencente ao TcV, mostraram que essa cepa induz maior produção de TNF e uma maior taxa TNF/IL10 em monócitos humanos *in vitro*, além de apresentar maior taxa de infecção em células trofoblásticas BeWo do que a cepa Y, pertencente ao TcII. Assim, a hipótese testada neste trabalho foi a de que a infecção por *T. cruzi* induz a produção de TNF assim como de seus receptores em células trofoblásticas humanas, e que uma maior produção dessa citocina resulta em um aumento na infecção nessas células. Para isso, avaliou-se a infecção, a expressão de TNF e seus receptores e da citocina anti-inflamatória IL-10 em células BeWo sincicializadas ou não, expostas às cepas Y e 3253, indutoras de menor e maior expressão de TNF em monócitos humanos, respectivamente. Estes parâmetros foram avaliados na presença ou ausência da pentoxifilina (PTX), uma droga que inibe os efeitos de TNF. Nossos resultados indicaram uma maior intensidade de infecção pela cepa Y em células BeWo não sincicializadas, enquanto a cepa 3253 foi capaz de infectar com maior intensidade após a sincicialização. O tratamento com PTX aumentou a intensidade de infecção pela cepa Y em células sincicializadas. A infecção por ambas as cepas induziram aumento na expressão de rTNF2, sendo esse aumento após a infecção pela cepa Y maior do que pela cepa 3253. Intensidades altas de infecção por ambas as cepas induziram também um aumento da expressão de TNF e IL-10. Em algumas populações não infectadas ou infectadas com a cepa 3253, o tratamento por 16 horas com PTX reduziu a expressão de TNF, enquanto o tratamento por 4 horas reduziu a expressão de rTNF2. A infecção por 3253 induziu o aumento da expressão de IL-6 e IL-8, enquanto a cepa Y levou à diminuição de IL-6. O tratamento com PTX resultou na

diminuição da expressão das duas citocinas. Os resultados mostram uma associação da expressão do rTNF2 com infecção de células trofoblásticas por *T. cruzi*, e que o tratamento com PTX aumenta a infecção de células BeWo sincicializadas pela cepa Y, mas não pela cepa 3253. Nossos dados evidenciam que isolados diferentes interagem de forma distinta com células placentárias humanas, e respondem diferentemente ao tratamento com PTX.

Palavras-chave: *T. cruzi*. Doença de Chagas congênita. TNF. Infecção de células placentárias. Transmissão materno-fetal.

## ABSTRACT

Chagas disease is a neglected tropical disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and endemic in Latin America. The modes of transmission include vectorial, through blood transfusion, oral or congenital. Congenital transmission is the main form of transmission in non-endemic countries, with an increase in the number of cases due to migration of woman of gestational age from endemic countries. The drugs utilized during Chagas disease treatment are not recommended for pregnant women, therefore, currently there are no methods of preventing congenital transmission. The *T. cruzi* population that infects humans is classified into *Discrete Typing Units* (DTUs), ranging from TcI to TcV and are associated with distinct biological and clinical characteristics, and to congenital transmission. Regions where infection occurs predominantly with strains belonging to TcII present lower maternal-fetal transmission rates, while regions where infection occurs mainly with TcV have higher transmission rates. Studies with the 3253 strain, belonging to TcV have shown that this strain can induce higher levels of the pro-inflammatory cytokine TNF and higher TNF/IL10 rates in human monocytes *in vitro*, besides showing higher infection rates in the trophoblastic BeWo cells than the Y strain, which belongs to TcII. Therefore, the hypothesis tested in this work is that the infection with *T. cruzi* leads to higher production of TNF as well as its receptors in human trophoblastic cells, and that higher production of this cytokine results in higher infection in these cells. For this purpose, the infection rates, expression of TNF and its receptors and of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was evaluated in BeWo cells, syncialized or not and exposed to the 3253 and Y strains. These parameters were evaluated in the presence or absence of pentoxifylline, a drug which inhibits the effects of TNF. Our results show a higher intensity of infection in non-syncialized BeWo cells by the Y strain, while the 3253 strain was able to infect the cells with higher intensity after syncialization. Treatment with the drug increased intensity of infection by the Y strain in syncialized BeWo cells. Infection with both strains induced an increase in TNFr2 expression, with higher expression observed with the Y strain rather than the 3253 strain. High intensities of infection also induced an increase in TNF and IL-10 expression. In some uninfected populations and those infected with the 3253 strain, 16-hour treatment with the drug led to reduced TNF expression, while 4-hour treatment reduced TNFr2 in uninfected cells. Infection with 3253 also induced an increase in IL-6 and IL-8 expression, while the Y strain led to a decrease in IL-6 expression. Treatment with PTX resulted in reduced expression of both cytokines. The results show the involvement of TNFr2 in the infection of trophoblastic cells

with *T. cruzi* and that pentoxifylline treatment increased syncialized BeWo infection with the Y strain, but not with the 3253 strain. Our results show that different *T. cruzi* isolates interact differently with human placental cells and respond distinctively to treatment with PTX.

Keywords: *T. cruzi*. Congenital Chagas disease. TNF. Placental cell infection. Maternal-fetal transmission.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
Figura 2- A barreira placentária.....	28
Figura 3- Imagens representativas de células BeWo e células BeWo sincicializadas (SynBeWo) infectadas ou não pelas cepas 3253 e Y de <i>T. cruzi</i> .....	40
Figura 4- Avaliação dos efeitos da pentoxifilina (PTX) na infecção de células BeWo e SynBeWo pelas cepas Y ou 3253. ....	41
Figura 5- Comparação entre a infecção pelas cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> em células BeWo e SynBeWo não tratadas ou tratadas com diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX). ....	43
Figura 6- Comparação entre a infecção pela cepa 3253 em células BeWo e SynBeWo tratadas com diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX). ....	45
Figura 7 – Comparação entre a infecção pelas cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> em células BeWo. ....	46
Figura 8- Comparação da infecção pelas cepas Y ou 3253 entre os diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX). ....	48
Figura 9- Comparação entre a infecção pelas cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> com os diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX). ....	49
Figura 10- Avaliação da expressão de TNF em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> . ....	50
Figura 11 – Comparação da expressão de TNF entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas as cepas Y ou 3253. ....	51
Figura 12 – Avaliação da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX). ....	52
Figura 13 – Avaliação da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253. ....	53
Figura 14 – Avaliação da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253. ....	54
Figura 15 – Comparação da expressão de TNF entre células BeWo infectadas com as cepas Y e 3253 de <i>T. cruzi</i> e células não expostas aos parasitos, tratadas com pentoxifilina PTX. ....	56

<b>Figura 16 – Comparação da expressão de TNF entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas e células expostas, mas não infectadas às cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> tratadas com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>57</b>
<b>Figura 17 – Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253 de <i>T.cruzi</i>. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE.</b> .....	<b>58</b>
<b>Figura 18 – Comparação da expressão de rTNF1 entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas as cepas Y ou 3253. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE.</b> .....	<b>59</b>
<b>Figura 19 -Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>60</b>
<b>Figura 20-Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>61</b>
<b>Figura 21 – Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>62</b>
<b>Figura 22 – Comparação da expressão de rTNF1 entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas, células infectadas com as cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> submetidas a diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>63</b>
<b>Figura 23– Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>64</b>
<b>Figura 24– Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253 de <i>T.cruzi</i>.</b> .....	<b>65</b>
<b>Figura 25 – Comparação da expressão de rTNF2 entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas as cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>66</b>
<b>Figura 26 – Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>67</b>
<b>Figura 27– Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253.</b> ...	<b>68</b>
<b>Figura 28 – Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>69</b>

<b>Figura 29 – Comparação da expressão de rTNF2 entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas, células infectadas com as cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> tratadas com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>71</b>
<b>Figura 30– Comparação da expressão de rTNF2 entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas e células expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> tratadas com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>72</b>
<b>Figura 31 – Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo infectadas ou expostas às cepas Y ou 3253 de <i>T.cruzi</i>.</b> .....	<b>73</b>
<b>Figura 32– Comparação da expressão de IL-10 entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas às cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>74</b>
<b>Figura 33– Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>75</b>
<b>Figura 34 – Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>76</b>
<b>Figura 35 – Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com PTX (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.</b> .....	<b>77</b>
<b>Figura 36– Comparação da expressão de IL-10 entre células BeWo não expostas aos parasitos e células BeWo infectadas com as cepas Y e 3253 de <i>T. cruzi</i> tratadas com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>79</b>
<b>Figura 37– Comparação da expressão de IL-10 entre células BeWo não expostas e células expostas, mas não infectadas às cepas 3253 ou Y de <i>T. cruzi</i> nos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).</b> .....	<b>80</b>
<b>Figura 38-t-SNE de células BeWo, células BeWo expostas à cepa y e células BeWo expostas à cepa 3253.</b> .....	<b>82</b>
<b>Figura 39-t-SNE de células BeWo tratadas com 50 ou 200µM de pentoxifilina (PTX) por 4 horas.</b> .....	<b>83</b>
<b>Figura 40- t-SNE de células BeWo tratadas com 50 ou 200µM de PTX por 16 horas.</b> ....	<b>84</b>
<b>Figura 41- t-SNE de células BeWo expostas à cepa 3253 e tratadas com 50 ou 200µM de PTX por 4 horas.</b> .....	<b>85</b>
<b>Figura 42- t-SNE de células BeWo expostas à cepa 3253 e tratadas com 50 ou 200µM de PTX por 16 horas.</b> .....	<b>86</b>
<b>Figura 43- t-SNE de células BeWo expostas à cepa Y e tratadas com 50 ou 200µM de PTX por 4 horas.</b> .....	<b>87</b>

<b>Figura 44- t-SNE de células BeWo expostas à cepa Y e tratadas com 50 ou 200µM de PTX por 16 horas.....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 45- Expressão de IL-6 e IL-8 no sobrenadante das culturas de BeWo expostas às cepas Y ou 3253.....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 46- Expressão de IL-6 e IL-8 no sobrenadante das culturas de BeWo e SynBeWo expostas às cepas Y ou 3253.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 47- Expressão de IL-6 e IL-8 no sobrenadante das culturas de SynBeWo expostas às cepas Y ou 3253 e tratadas com pentoxifilina (PTX).....</b>	<b>91</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
Br	Bromo
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CBA	<i>Cytometric Beads Array</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control</i>
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína ( <i>Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester</i> )
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i>
FBS	Soro fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
GP	Glicoproteína
hCG	Gonadotrofina coriônica humana ( <i>Human Chorionic Gonadotropin</i> )
HE	Hematoxilina-Eosina
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
kDNA	DNA do cinetoplasto ( <i>Kinetoplast DNA</i> )
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase da matriz ( <i>Matrix metalloproteinase</i> )
NK	<i>Natural Killer</i>
PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PTX	Pentoxifilina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rsTNF	Receptor Solúvel de TNF
rTNF	Receptor de TNF
SynBewo	Células Bewo Sincializadas
TA	Temperatura Ambiente
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma Cruzi</i>
Th	Linfócito T <i>Helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral ( <i>Tumoral Necrosis Factor</i> )
t-SNE	<i>t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>
µg	Micrograma
µm	Micrômetros
µM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas</b> .....	23
<b>1.2 Doença de Chagas congênita</b> .....	25
<b>1.3 A transmissão materno-fetal de <i>T. cruzi</i></b> .....	27
<b>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	33
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	33
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1 Linhagens celulares</b> .....	34
<b>4.2 Obtenção das formas tripomastigotas de <i>T. Cruzi</i></b> .....	34
<b>4.3 Infecção de células BeWo não sincicializadas e sincicializadas (SynBeWo) com tripomastigotas e tratadas ou não com diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX)</b> .....	35
<b>4.4 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)</b> .....	36
<b>4.5 Análise da produção de citocinas no sobrenadante das culturas por CBA</b> .....	36
<b>4.6 Marcação dos tripomastigotas com CFSE</b> .....	36
<b>4.7 Infecção de células BeWo com tripomastigotas para análise de infecção, expressão de citocinas e seus receptores</b> .....	37
<b>4.8 Análise da expressão de receptores e citocinas em citômetro de fluxo</b> .....	37
<b>4.9 Análises estatísticas</b> .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	39
<b>5.1 Análise da infecção de células BeWo e SynBeWo pelas cepas Y ou 3253 na presença ou ausência de diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX) por coloração histológica</b> .....	39

<b>5.1.1 Comparação entre a infecção de células BeWo e SynBeWo não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de PTX .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.2 Comparação entre a infecção pela cepa Y e pela cepa 3253 de células BeWo e SynBeWo submetidas ou não aos diferentes tratamentos com PTX .....</b>	<b>42</b>
<b>5.1.3 Comparação entre a infecção de células BeWo e de células SynBeWo tratadas ou não com PTX pelas diferentes cepas .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2 Avaliação da infecção, expressão de citocinas e de receptores de TNF por citometria de fluxo .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.1 As cepas Y e 3253 de <i>T. cruzi</i> infectam células BeWo de maneira similar .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.2 O tratamento com PTX não altera a intensidade ou percentagem de células BeWo CFSE+ infectadas com as cepas Y ou 3253 .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.3 A infecção com os diferentes isolados não é diferentemente afetada pela PTX.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.4 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento da expressão de TNF em células BeWo .....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.5 Células BeWo expostas aos parasitos, mas não infectadas exibem menor intensidade de expressão de TNF que células infectadas com as cepas Y ou 3253.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.6 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou percentagem de expressão de TNF em células BeWo .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2.7 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou percentagem de expressão de TNF em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253 .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2.8 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com PTX .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.9 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento na expressão do receptor 1 de TNF (rTNF1) em células BeWo .....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.10 A percentagem e intensidade de expressão de rTNF1 não são significativamente diferentes em células BeWo infectadas e não infectadas, mas expostas aos parasitos .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2.11 As diferentes durações de tratamento com diferentes concentrações de PTX não alteram a expressão de rTNF1 em células BeWo somente nem em células infectadas com as cepas Y ou 3253 .....</b>	<b>60</b>

5.2.12 O tratamento com 200µM de PTX por 16 horas diminui a porcentagem de expressão de rTNF1, mas aumenta sua intensidade em células expostas à cepa 3253.....	62
5.2.13 Células BeWo infectadas com a cepa 3253 e tratadas com PTX 200µM por 4 horas apresentam maior porcentagem de expressão de rTNF1 .....	63
5.2.14 Células BeWo expostas, mas não infectadas com as cepas Y ou 3253 tratadas com 50µM de PTX por 16 horas apresentam menor intensidade de expressão de rTNF1 .....	64
5.2.15 A infecção e exposição às cepas Y ou 3253 induz a um aumento na porcentagem de expressão de rTNF2 em células BeWo.....	65
5.2.16 Células BeWo expostas à cepa 3253, mas não infectadas expressam mais rTNF2 do que células infectadas.....	66
5.2.17 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou porcentagem de expressão de rTNF2 em células BeWo somente ou em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253.....	67
5.2.18 A exposição à cepa Y induz um aumento da expressão de rTNF2 em células BeWo tratadas com PTX.....	70
5.2.19 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento da expressão de IL-10 em células BeWo .....	73
5.2.20 Células expostas aos parasitos, mas não infectadas exibem maior porcentagem de expressão de IL-10 que células infectadas com as cepas Y ou 3253.....	74
5.2.21 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou porcentagem de expressão de IL-10 em células BeWo somente ou em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253.....	75
5.2.22 A exposição aos parasitos induziu uma diminuição na intensidade e aumento na porcentagem de expressão de IL-10 em células BeWo submetidas ao tratamento com PTX.....	78
5.3 Análises de t-SNE da infecção, expressão de citocinas e receptores por células BeWo infectadas com as cepas Y ou 3253 de <i>T. cruzi</i> .....	81
5.3.1 A infecção pelas cepas Y ou 3253 altera a expressão de citocinas e receptores de TNF .....	81
5.3.2 O tratamento com 200µM de PTX por 4 horas induz aumento de intensidade de expressão de rTNF1 em células BeWo.....	83

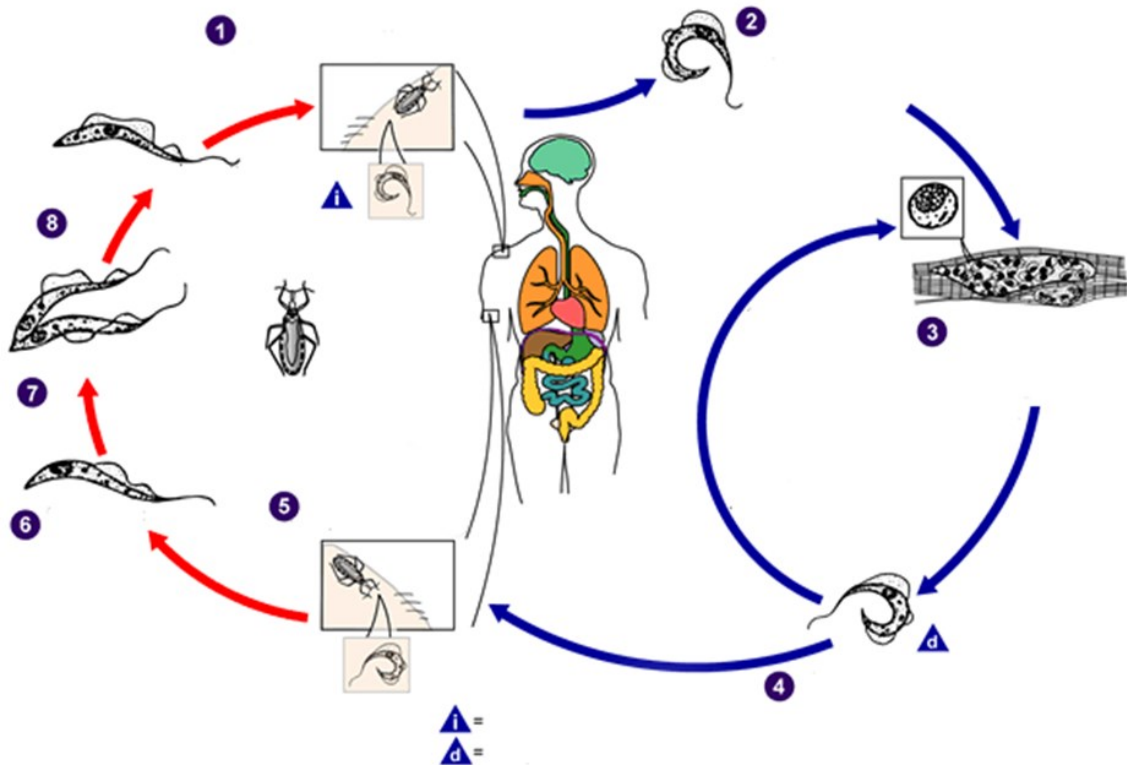
<b>5.3.3 O tratamento com 200µM de PTX por 16 horas induz aumento de intensidade de expressão de rTNF1 e diminuição de TNF em células BeWo.....</b>	<b>84</b>
<b>5.3.4 O tratamento com diferentes concentrações de PTX por 4 horas não altera a expressão de citocinas e receptores por células BeWo expostas à cepa 3253 .....</b>	<b>85</b>
<b>5.3.5 O tratamento com 50 e 200µM de PTX por 16 horas diminui a expressão de TNF em células BeWo expostas à cepa 3253 .....</b>	<b>86</b>
<b>5.3.6 O tratamento com 50 ou 200µM de PTX por 4 horas aumenta a intensidade de expressão de IL-10 em células BeWo expostas à cepa Y .....</b>	<b>87</b>
<b>5.3.7 O tratamento com 200µM de PTX por 16 horas diminui a expressão de TNF em células BeWo expostas à cepa Y .....</b>	<b>88</b>
<b>5.4 Análise da expressão de citocinas no sobrenadante das culturas de BeWo e SynBeWo .....</b>	<b>89</b>
<b>5.4.1 A infecção pela cepa 3253 induz alta expressão de IL-6 e IL-8.....</b>	<b>89</b>
<b>5.4.2 Células BeWo sincicializadas e infectadas com a cepa 3253 tem maior expressão de IL-6 e IL-8 do que células BeWo não sincicializadas .....</b>	<b>90</b>
<b>5.4.3 O tratamento com PTX por 16 horas diminui a expressão das citocinas IL-6 e IL-8 em SynBeWo infectadas com a cepa 3253 .....</b>	<b>91</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>103</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que entre 6 e 7 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, sendo a maioria encontrada na América Latina. Nesta região, a doença é endêmica em 21 países e causa cerca de 10.000 mortes por ano (*World Health Organization (WHO)*, 2020).

O ciclo de vida do parasito tem a participação de insetos triatomíneos, que são o hospedeiro invertebrado do protozoário. Um triatomíneo infectado, ao fazer o repasto sanguíneo em um humano ou animal, libera na excreta as formas tripomastigotas metacíclicas, que podem penetrar através do local da picada ou por mucosas. Essas formas invadem as células do hospedeiro vertebrado, onde se diferenciam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam dentro das células e, posteriormente, se diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células e caem na corrente sanguínea. As tripomastigotas podem infectar células em uma variedade de tecidos, onde se transformam novamente em formas amastigotas dando continuidade ao ciclo infeccioso. O hospedeiro invertebrado pode se infectar ao ingerir sangue contaminado com as formas tripomastigotas, que vão se transformar em epimastigotas no intestino médio e se multiplicar. Elas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior, podendo infectar novos hospedeiros vertebrados após a picada do triatomíneo (*Centers for Disease Control (CDC)*, 2019). A figura 1 mostra o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



**Figura 1-Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** Fonte: Centers for Disease Control (CDC) - <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/>. Acessado em jan. 2021

Além da transmissão vetorial, outras formas de infecção incluem a oral, através da ingestão de alimentos contaminados; congênita, transfusional e acidentes de laboratório.

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas distintas, a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é caracterizada por elevada parasitemia e parasitismo tecidual. Geralmente é assintomática, podendo ocorrer febre, fraqueza, mal-estar, aumento do fígado e baço e chagoma de inoculação no local da picada, denominado sinal de Romaña quando é caracterizado por edema unilateral na região da pálpebra (WHO, 2020). Entre dois e três por cento dos indivíduos infectados, em sua maioria crianças menores de 3 anos, morre devido à miocardiopatia aguda, geralmente acompanhada de comprometimento meningoencefálico. A fase aguda apresenta duração de aproximadamente 60 dias com redução da parasitemia após esse período, caracterizando o estabelecimento da fase crônica da infecção (CARLIER; TRUYENS, 2015).

Durante a fase crônica, a maioria (60-70%) dos pacientes se apresentam assintomáticos e sem danos aos órgãos, sendo esta forma clínica denominada indeterminada. Muitos pacientes podem permanecer assintomáticos durante toda a vida, porém 30-40% dos chagásicos podem desenvolver as formas cardíacas e/ou digestivas da doença. A forma digestiva é caracterizada



pela dilatação do esôfago e cólon, sendo denominados “megas”. No Brasil central, o comprometimento do esôfago ocorre entre 7 e 10% dos pacientes crônicos infectados, enquanto o comprometimento do cólon ocorre entre 5 e 10%. Nesses casos, ocorre denervação da musculatura lisa que reveste o tubo digestivo, levando a dificuldades de deglutição e defecação (DIAS, 2017). A forma cardíaca é a forma sintomática mais frequentemente encontrada, de maior morbidade e mortalidade, afetando 20-30% dos pacientes infectados e se caracterizando por arritmia e insuficiências cardíacas que podem ser fatais (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Também pode ocorrer síndrome tromboembólica, com comprometimento dos pulmões, cérebro, rins, baço e outros órgãos (DIAS, 2017).

*T. cruzi* apresenta uma grande diversidade genética, tendo suas linhagens classificadas em Discrete Typing Units (DTUs), de acordo com semelhanças genéticas e biológicas (ANNONYMOUS, 1999; TIBAYRENC, 2003; ZINGALES et al., 2009). Existem 7 DTUs, denominados TcI a TcVI, e TcBat isolado de morcegos, que apresentam distintas distribuições geográficas. Na América do Norte e Central, encontram-se predominantemente o TcI e TcIV. Já na América do Sul, existe uma grande variedade na distribuição dos DTUs. No Brasil, ao norte da região amazônica, predomina o TcI (BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016; MAGALHÃES et al., 2022). TcII é encontrado na maioria dos casos na região central e nas regiões sudeste e nordeste, seguido por TcVI (MAGALHÃES et al., 2022; NIELEBOCK et al., 2020; RODRIGUES-DOS-SANTOS et al., 2018; TAVARES DE OLIVEIRA et al., 2020). Em algumas regiões do Sul do Brasil e na maioria dos países do cone sul, há o predomínio de infecções por TcV (LUQUETTI et al., 2015). O TcIII está mais associado ao ciclo silvestre, enquanto os TcsII, IV, V e VI são mais frequentemente encontrados no ciclo doméstico e o TcI circula em hospedeiros domésticos e silvestres (BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016; MAGALHÃES et al., 2022).

## **1.2 Doença de Chagas congênita**

Com medidas de controle vetorial e diminuição da transmissão vetorial, a forma congênita da doença de Chagas vem apresentando maior importância epidemiológica, representando 22% dos novos casos em regiões endêmicas (CARLIER et al., 2015). A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 1.125.000 mulheres em idade gestacional estão infectadas por *T. cruzi* na América Latina, com uma taxa de 8.668 casos/ano. A taxa de

transmissão materno-fetal é estimada em 4.7% nos países endêmicos, apresentando variações entre eles: a infecção congênita por *T. cruzi* foi identificada em 6% dos neonatos na Argentina, 4.1% na Bolívia, 4.3% no Paraguai e 1.7% no Brasil (revisado por CARLIER et al., 2015). Através de migrações de mulheres de regiões endêmicas para não-endêmicas, a transmissão congênita é a principal forma de transmissão em países como EUA, Espanha, Suécia, Japão, Suíça e Canadá (CARLIER; TRUYENS, 2017; RODARI et al., 2018).

A maioria dos neonatos infectados congenitamente é assintomática ao nascimento, porém apresenta maiores taxas de baixo peso, prematuridade e valores menores na escala de Apgar do que neonatos não infectados (KEMMERLING et al., 2019; TORRICO et al., 2004). A doença se apresenta na forma aguda, com sintomas inespecíficos que dificultam o diagnóstico. Alguns recém-nascidos apresentam sintomas graves, que levam rapidamente à morte (TORRICO et al., 2004). Os recém-nascidos não tratados podem apresentar complicações futuras, desenvolvendo sintomas da doença de Chagas crônica, que apresenta menor taxa de cura (CARLIER; TRUYENS, 2015). O diagnóstico é feito comumente pela observação de parasitos no sangue periférico ou no sangue do cordão umbilical, sendo mais utilizadas as técnicas de concentração do microhematócrito ou de Strout (BALOUZ; AGÜERO; BUSCAGLIA, 2017; CARLIER et al., 2019). Caso o resultado seja negativo ao nascimento, o teste deve ser repetido após 1 mês, quando há o pico da parasitemia (CARLIER et al., 2019). O diagnóstico sorológico pode ser feito a partir dos dez meses de idade, quando desaparecem os anticorpos IgG transferidos passivamente pela mãe. Métodos moleculares, como a PCR, apresentam maior sensibilidade e têm sido utilizados em países como Chile, Argentina, Espanha e Suíça (PICADO et al., 2018), porém podem apresentar falso-negativos devido à transferência placentária de DNA do parasito (CARLIER; TRUYENS, 2015; VIRREIRA et al., 2007). A infecção congênita é confirmada se o paciente nascido de mãe infectada apresentar exames parasitológicos ou sorológicos positivos e outras formas de transmissão, como vetorial e através de transfusão de sangue, forem descartadas (BALOUZ; AGÜERO; BUSCAGLIA, 2017; CARLIER et al., 2019). O tratamento pode ser feito com as drogas benzonidazol ou nifurtimox e apresenta alta eficácia se realizado antes do primeiro ano de vida, com 90-100% dos pacientes apresentando sorologia negativa entre 3 e 16 meses depois do tratamento (CARLIER; TRUYENS, 2017; APT, 2017).

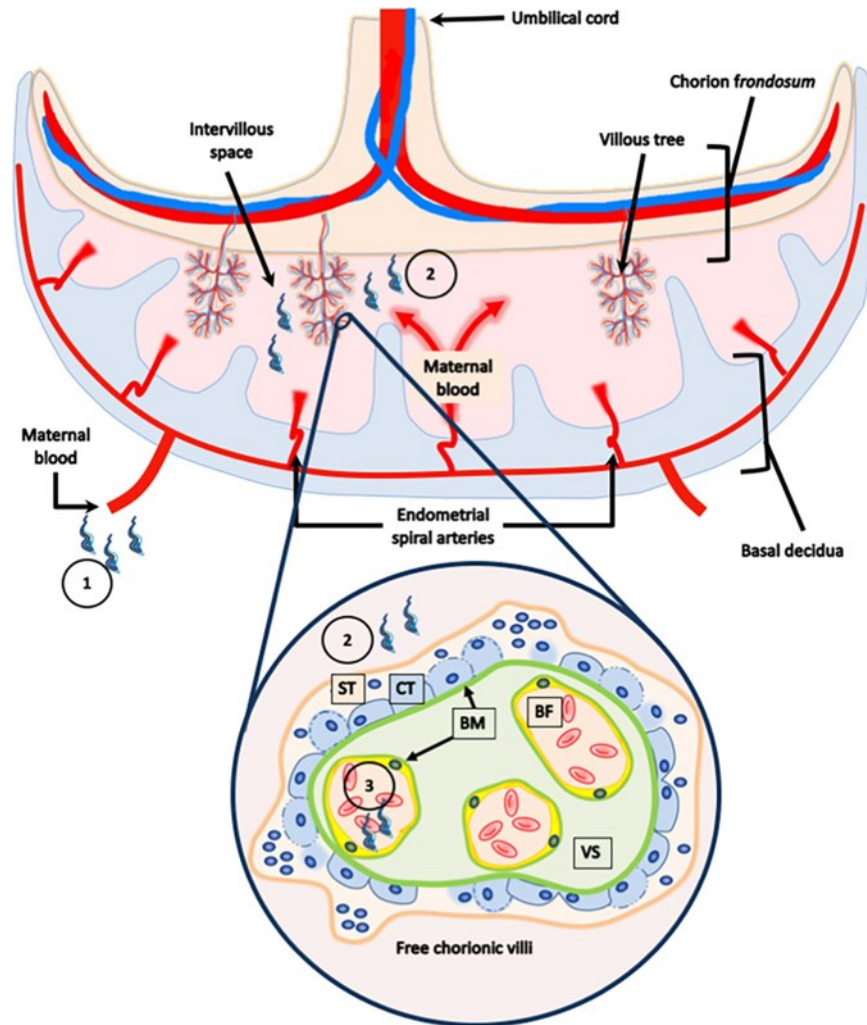
Os medicamentos utilizados para o tratamento da doença de Chagas não são recomendados para gestantes devido ao desconhecimento de seus efeitos no feto e aos efeitos adversos causados em adultos (VIOTTI et al., 2009). Assim, no momento, não há maneira de

impedir a transmissão congênita. As mães são tratadas após o parto e lactação, para impedir transmissões congênitas futuras (CARLIER; TRUYENS, 2015).

### **1.3 A transmissão materno-fetal de *T. cruzi***

A placenta é um órgão temporário que separa os compartimentos materno e fetal durante a gestação, sendo responsável pela troca metabólica entre mãe e feto e tem funções endócrinas e imunes (ARORA et al., 2017). Com um papel regulatório no sistema imune, consegue proteger o feto de patógenos. A placenta humana é composta de vilosidades coriônicas, que são formadas pelo trofoblasto e estroma viloso. O trofoblasto é uma camada bi-estratificada, composta de um epitélio não proliferativo superficial ou sinciciotrofoblasto, e uma camada germinal proliferativa, ou citotrofoblasto. A camada trofoblástica separa-se do estroma viloso por uma lâmina basal. Portanto, trofoblasto, lâmina basal e estroma viloso formam a barreira placentária que *T. cruzi* deve atravessar para infectar o feto (KEMMERLING et al., 2019) (Figura 2).

O sinciciotrofoblasto está em contato direto com o sangue materno no espaço intervilositário e, portanto, é a primeira camada exposta ao parasito. A alta carga de *T. cruzi* pode induzir à destruição dessa camada (DUASO et al., 2010). Na lâmina basal, o parasito pode se ligar a componentes da matriz extracelular através de moléculas de superfície como glicoproteína 85 (gp85) e gp83 (NDE et al., 2006). Ao chegar no estroma viloso, o parasito produz diversas proteases, como por exemplo cruzipaina, responsável pela destruição de colágeno I. Metaloproteinases da matriz, como MMP-2 e MMP-9, tem sua expressão aumentada na presença do parasito (KEMMERLING et al., 2019). A desorganização da complexa matriz extracelular pode facilitar a mobilidade e entrada de *T. cruzi* nas células (DUASO et al., 2010).



**Figura 2- A barreira placentária.** O parasito presente no sangue materno (1), que entra em contato com o trofoblasto no espaço intervilloso (2), deve atravessar a barreira placentária para atingir os capilares do feto (3) e realizar a infecção. BM: Membrana basal; CT: Citotrofoblasto; ST: Sincitiotrofoblasto; VS: Estroma viloso. Fonte: KEMMERLING et al., 2019.

Durante a gestação, a resposta imune é caracterizada por um balanço delicado entre tolerância e ativação, com maior número de células T reguladoras para evitar a rejeição ao feto. O sistema imune materno é fisiologicamente orientado a um tipo Th2, visando proteger a placenta e o feto dos efeitos negativos da inflamação (KEMMERLING et al., 2019). A resposta imune ao *T. cruzi* é uma resposta primariamente Th1, com produção da citocina inflamatória IFN- $\gamma$  por células NK e posteriormente por células TCD4 Th1 e TCD8. Esta citocina, juntamente com o TNF- $\alpha$  ativa as propriedades microbicidas dos macrófagos, sendo essencial para o controle da infecção (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; TRUYENS; CARLIER, 2017). Estudos em camundongos mostram que esta resposta imune inflamatória tem efeitos graves na gestação quando o hospedeiro se encontra na fase aguda, associado com uma produção aumentada de TNF- $\alpha$  (RIVERA et al., 1995). Em casos de transmissão congênita

severa em humanos, resultando em abortos ou morte prematura de neonatos, foi encontrado um ambiente altamente inflamatório na placenta, com presença de macrófagos, linfócitos TCD8 e intensa produção de TNF (CARLIER; TRUYENS, 2015). Outros estudos observaram no soro de mulheres grávidas infectadas menores níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  do que em mulheres não grávidas infectadas (CARDONI; GARCÍA; DE RISSIO, 2004) evidenciando a imunossupressão que ocorre durante a gravidez (TRUYENS; CARLIER, 2017); KEMMERLING et al., 2019).

Entre fatores que estão relacionados com a transmissão ao feto, a parasitemia é um dos mais determinantes. Na fase crônica da infecção, diversos estudos reportam que mães transmissoras tem quantidade de parasitos no sangue de 10 a 20 vezes maior do que mães não transmissoras (HERMANN et al., 2004; CARLIER; TRUYENS, 2015; VIRREIRA et al., 2007). A taxa de transmissão também é maior quando a mãe se encontra na fase aguda (revisado por BITTENCOURT, 1992) e casos em caso de co-infecção por HIV (SCAPELLATO; BOTTARO; RODRÍGUEZ-BRIESCHKE, 2009) quando a parasitemia apresenta níveis elevados.

A resposta imune materna também é um fator determinante na transmissão. Comparações entre respostas imunes de mães que transmitiram a infecção e mães que não transmitiram a infecção para o feto mostraram menor produção de IFN- $\gamma$  em resposta a antígenos do parasito por células do sangue de mães transmissoras (HERMANN et al., 2004). Além disso, apresentaram menores níveis circulantes de TNF e de receptor 1 de TNF (rTNF1) no plasma e menor liberação espontânea de TNF por leucócitos do sangue periférico (CARDONI; GARCÍA; DE RISSIO, 2004; GARCÍA et al., 2008). Esses resultados evidenciam a necessidade de um balanço entre respostas inflamatórias e anti-inflamatórias durante a gravidez para evitar danos ao feto e a transmissão congênita de *T. cruzi*.

Até o momento, com os marcadores utilizados atualmente, não há associação clara entre os DTUs e a doença de Chagas congênita. Todos os Tcs, com exceção de TcIV e TcBat, já foram encontrados em indivíduos infectados por essa via de transmissão. TcV foi associado com 80-100% dos casos de infecção congênita na Argentina, Bolívia, Paraguai, Chile e no sul do Brasil (CARLIER; TRUYENS, 2017). A frequência de distribuição dos diferentes DTUs em neonatos é semelhante à encontrada na população local em regiões endêmicas na Bolívia (VIRREIRA et al., 2007). A análise da região do minicírculo de kDNA revelou perfis idênticos entre mães e filhos, o mesmo ocorrendo para gestação de gêmeos (BURGOS et al., 2007). Já no Brasil, foram identificadas taxas de transmissão congênicas distintas em diferentes regiões.

Na região central, onde há predomínio de TcII, a taxa de transmissão reportada foi de 2%, enquanto no estado do Rio Grande do Sul, onde predomina o TcV, a taxa reportada foi de 5%, similar à de outros países com predomínio de TcV (LUQUETTI et al., 2011, 2015).

Apesar da ausência clara de correlação entre os DTUs e a transmissão da doença de Chagas, alguns estudos evidenciam diferenças na infectividade de placentas e células placentárias pelas diferentes cepas do parasito. Juiz et al., (2017) reportou que parasitos da cepa VD (TcVI), isolados de um caso de transmissão congênita, apresentaram maior tropismo placentário em camundongos do que a cepa K98 (TcI). Essa cepa congênita também demonstrou maior infectividade em explantes placentários e em células trofoblásticas BeWo, utilizadas como modelo experimental da placenta, do que a cepa Y (MEDINA et al., 2018).

Estudos realizados por nosso grupo também identificaram diferentes capacidades de infectar células placentárias entre cepas de *T. cruzi*. A cepa 3253, pertencente ao TcV, infectou maior porcentagem de células BeWo do que a cepa AM64 (pertencente ao TcIV) e a cepa Y. Além disso, ao infectar monócitos, essa cepa induziu um perfil mais inflamatório, com alta produção da citocina TNF e IL-12 e maior taxa TNF/IL-10 do que as outras duas cepas (MAGALHÃES, 2017). Em casos graves de doença de Chagas congênita, o TNF é produzido intensamente, associado com destruição da barreira trofoblástica (ALTEMANI; LANA; BITTENCOURT, 2000). A inflamação placentária causada por patógenos, com influxo de células mononucleares, também está associada com a ruptura trofoblástica (JULIANO; BLOTTA; ALTEMANI, 2006). A citocina está relacionada com a cardiopatia chagásica crônica (RODRIGUES et al., 2012) e com lesões cutâneas na leishmaniose mucosa (FARIA et al., 2005). A administração de pentoxifilina (PTX), um inibidor não seletivo de fosfodiesterases (ESSAYAN, 2001) e da produção de TNF por células imunes humanas (MARQUES et al., 1999), é utilizada com sucesso tratamento da leishmaniose, sendo aprovada para formas refratárias da doença. A associação da PTX com antimonial diminui o tempo de cura das lesões da leishmaniose cutânea e mucosa, e é mais eficiente do que o tratamento somente com antimonial (BRITO et al., 2014; MACHADO et al., 2007). Em experimentos com camundongos, o bloqueio de TNF pela droga Infliximab reduziu a patologia cardíaca, como arritmias cardíacas e deposição de fibronectina causadas pela infecção com *T. cruzi* (PEREIRA et al., 2014). O papel desta citocina em mecanismos relacionados à transmissão congênita da doença de Chagas, no entanto, ainda não está bem estabelecido.

Considerando-se a associação de TNF com eventos inflamatórios que, por sua vez, associam-se à infecção congênita, a hipótese deste trabalho é que a infecção por *T. cruzi* induz

a produção dessa citocina por células trofoblásticas, e que sua modulação reduz a infecção destas células.

## **2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

A transmissão congênita tem se tornado cada vez mais importante do ponto de vista epidemiológico, especialmente pela migração de mulheres em idade gestacional para países não-endêmicos, o que vem aumentando o número de casos de doença de Chagas nessas regiões. O esclarecimento dos mecanismos que influenciam a transmissão congênita pode auxiliar no desenvolvimento de medidas de profilaxia e controle da doença de Chagas congênita, visto que até o momento não há drogas disponíveis para o uso durante a gravidez. De maneira mais ampla, pode auxiliar na diminuição das mortes e complicações clínicas relacionadas com essa forma de transmissão.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar o envolvimento do fator de necrose tumoral (TNF) na infecção de células placentárias humanas por formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Em linhagens de células trofoblásticas (placentárias) humanas, antes e após sincicialização, expostas a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* pertencentes a diferentes cepas, avaliar:

- A porcentagem e intensidade de infecção;
- A porcentagem e intensidade de expressão de TNF, de receptores I e II de TNF e da citocina anti-inflamatória IL-10;
- Avaliar o efeito do bloqueio da atividade de TNF pelo tratamento com diferentes concentrações de pentoxifilina nos parâmetros acima, avaliando seu papel como potencial controle da transmissão congênita.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens celulares

Células LLC-MK2, linhagem epitelial de rim de macaco, obtidas através de doação do professor Ricardo Toshio Fujiwara (Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG), foram mantidas em frascos de cultura de 75cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*-GIBCO, EUA) suplementado com 5% de SFB (Soro Fetal Bovino-GIBCO) inativado, 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL e estreptomicina 0.1g/mL-GIBCO) e 2,025mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA). Células BeWo, obtidas por meio de doação da professora Eloísa Amália Vieira Ferro (Universidade Federal de Uberlândia-UFB), linhagem trofoblástica, foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB inativado e 1% de antibiótico (penicilina 100U/mL e estreptomicina 0.1g/mL) e 2,025mM de L- glutamina. Para indução da sincicialização das células BeWo, 8-Bromoadenosina 3', 5' monofosfato cíclico (8 Br-cAMP, Sigma–Aldrich), diluído em RPMI 1640 e filtrado com filtro de 0.22µM, foi adicionado ao meio de cultura durante 48h, em uma concentração de 100µM (WICE et al., 1990). Os frascos de cultura foram mantidos em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C.

Para a passagem das linhagens, as células foram lavadas com 10ml de PBS (GIBCO) e então expostas a 1 mL de tripsina (Sigma) por 2 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionado meio de cultura, que foi recolhido em tubos Falcon para centrifugação. Células LLC-MK2 foram centrifugadas a 600g, 4°C por 10 minutos e células BeWo foram centrifugadas a 300g, por 8 minutos a 4°C. O pellet foi ressuscitado em meio de cultura e as células foram contadas em hemocitômetro realizando-se o teste de exclusão com azul de Trypan. 1x10<sup>6</sup> células foram adicionadas a novas garrafas de 75cm<sup>2</sup> para continuação da manutenção das culturas.

### 4.2 Obtenção das formas tripomastigotas de *T. Cruzi*

Células LLC-MK2, na quantidade de 1x10<sup>6</sup>, foram semeadas em garrafas de cultura de 75cm<sup>2</sup>, contendo meio RPMI 1640 com 1% de SFB, 1% antibiótico e 2,025mM de L-glutamina.

Decorrido o tempo de adesão,  $1 \times 10^7$  tripomastigotas da cepa Y ou 3253 foram colocados nas garrafas e lavadas no dia seguinte com PBS 1x para remoção dos parasitos que não infectaram as células. Os frascos de cultura infectados foram mantidos em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C. O meio foi trocado diariamente. As formas tripomastigotas começaram a ser liberadas no sobrenadante após o quarto dia de cultura da cepa Y e sétimo dia de cultura da cepa 3253. O sobrenadante foi centrifugado a 1000g, por 10 minutos a 4°C, ressuspendido em PBS 1x e os parasitos contados em hemocitômetro.

A cepa Y foi obtida através de doação da professora Luciana de Oliveira Andrade (Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG) e a cepa 3253, por doação da professora Eliane Lages Silva (Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM).

#### **4.3 Infecção de células BeWo não sincicializadas e sincicializadas (SynBeWo) com tripomastigotas e tratadas ou não com diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX)**

Para avaliar o efeito da PTX na infecção de células BeWo e SynBeWo com as cepas Y e 3253 de *T. cruzi*,  $1 \times 10^5$  células BeWo foram semeadas em placas de cultura de 24 poços e induzidas à sincicialização por 48h com 8-br-cAMP em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C. Após esse período, as células foram lavadas uma vez com PBS 1x e PTX (EMS, Brasil), previamente diluída em RPMI, foi adicionada ao meio de cultura por uma hora. Em seguida, as células foram expostas a  $2 \times 10^6$  tripomastigotas da cepa Y ou 3253, durante 3 horas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram lavadas 3 vezes com PBS 1x para retirar os parasitos que não infectaram e foram incubadas em estufa com atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C por 12 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante das culturas foi recolhido e armazenado em -80°C até o momento da análise de citocinas por *Cytometric Bead Array* (CBA). A PTX foi adicionada ao meio de cultura nas concentrações finais de 50 ou 200µM, uma hora antes da exposição aos parasitos, durante as 3 horas de infecção e durante todo o restante do período de incubação, totalizando 16 horas de tratamento.

#### 4.4 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

Células BeWo e SynBeWo, infectadas com as cepas Y ou 3253 e expostas à 16h de tratamento com PTX nas concentrações de 50 ou 200 $\mu$ M foram lavadas 3x com PBS 1x e em seguida fixadas com formaldeído 2%, por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e coradas com hematoxilina por 45 segundos. As amostras foram então submetidas a um banho de água corrente por 5 minutos e em seguida coradas com eosina por 1 minuto. Após uma nova lavagem com água corrente por 2 segundos, ocorreu uma sequência de banhos com álcool 70, 80, 95% e 3 banhos com álcool absoluto, seguidos por 3 banhos com xilol com duração de 5 segundos cada. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck) e levadas ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG para escaneamento com o scanner de lâminas 3D Histeck (Hungria). As imagens foram analisadas utilizando o *software* SlideViewer 2.6 (3D Histeck).

#### 4.5 Análise da produção de citocinas no sobrenadante das culturas por CBA

A quantificação das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF e IL-1 $\beta$  no sobrenadante das culturas de células BeWo foi realizada através de CBA (BD Biosciences, EUA) seguindo as instruções do fabricante e lidas no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences). Os resultados foram expressos por meio de *heatmap* utilizando a plataforma ClustVis (METSALU; VILO, 2015).

#### 4.6 Marcação dos tripomastigotas com CFSE

Para a análise em citômetro de fluxo da frequência de células em contato com o parasito, assim como a densidade de parasitos por célula, tripomastigotas da cepa Y ou 3253, na concentração de  $6 \times 10^7$  parasitos/ml foram expostos a éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE-Sigma) na concentração de 5 $\mu$ M por 15 minutos em estufa úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os parasitos foram lavados 3 vezes por centrifugação com PBS 1x com 10% de SFB e utilizados para infecção de células BeWo.

#### **4.7 Infecção de células BeWo com tripomastigotas para análise de infecção, expressão de citocinas e seus receptores**

Para análise da infecção e expressão de citocinas e receptores em citômetro de fluxo, células BeWo, na quantidade de  $8 \times 10^5$  foram semeadas em placas de 6 poços e, após adesão, foi adicionado meio de cultura contendo PTX por uma hora. Em seguida, foram expostas a tripomastigotas da cepa Y ou 3253 marcados com CFSE em uma razão de 10 parasitos por célula durante 3 horas. Em seguida, foram lavadas 3 vezes com PBS 1x para remoção dos tripomastigotas que não infectaram e foram incubadas durante 12 horas em estufa úmida, a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. Para avaliar se a PTX produz efeitos durante a infecção com o parasito ou durante sua proliferação no interior das células, duas formas distintas de tratamento foram efetuadas: em uma, PTX nas concentrações finais de 50 ou  $200\mu\text{M}$  foi adicionada ao meio de cultura uma hora antes e durante as 3 horas de infecção do parasito, totalizando 4 horas de tratamento; na outra, PTX nas concentrações finais de 50 ou  $200\mu\text{M}$  foi adicionada ao meio de cultura uma hora antes e durante todo o período de incubação, totalizando 16 horas de tratamento.

#### **4.8 Análise da expressão de receptores e citocinas em citômetro de fluxo**

Após as incubações descritas acima, foram realizadas análises em citometria de fluxo para determinar a porcentagem de células infectadas e expressão dos receptores para citocinas. Nas culturas para avaliação da infectividade, as células expostas aos parasitos marcados com CFSE foram tripsinizadas e centrifugadas a 600g, por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , fixadas com formaldeído 2%, lavadas por centrifugação com PBS 1x e lidas no citômetro de fluxo FACS Canto II.

Para a avaliação da expressão de citocinas e seus receptores, foi adicionada Brefeldina A (Biolegend, EUA) na concentração de  $1\mu\text{g/mL}$  em cada poço, pelas 4 horas finais da cultura. A seguir, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 600g, por 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e lavadas por centrifugação com PBS 1x. Em seguida, foram adicionados anticorpos contra moléculas de superfície, diluídos em solução do kit LIVE/DEAD<sup>TM</sup> Fixable Violet Dead Cell Stain (Invitrogen, EUA), por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . A solução de LIVE/DEAD foi utilizada para exclusão das células mortas e foi diluída em uma concentração de 1:250 em PBS 1x. Os tubos foram

incubados por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram centrifugadas e fixadas com formaldeído 2% por 20 minutos a TA e então lavadas 3 vezes com PBS 1x por centrifugação. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução de saponina 0,5% por 15 minutos a TA, centrifugadas e incubadas com anticorpos anti-citocinas, diluídos na mesma solução, por 30 minutos a TA. Os tubos foram então lavados com saponina 0,5% duas vezes por centrifugação, seguido por duas lavagens com PBS 1x e levados para leitura no citômetro de fluxo FACS canto II. Os anticorpos contra marcadores de superfície utilizados foram anti-CD120a (rTNF1) -APC clone W15099A e anti-CD120b (rTNF2) -PE clone HTNFR-M1; os anticorpos anti-citocinas utilizados foram anti-TNF-BV510 clone MAb11 e anti-IL-10-PE-Cy7 clone JES3-9D7. Todos os anticorpos foram obtidos da Biolegend, com exceção do CD120b que foi obtido da BD Biosciences. Foram coletadas pelo menos 50.000 células/amostra. Análises direcionadas por seleção de populações específicas foram realizadas utilizando o programa FlowJo V10 (BD Biosciences) Análises não supervisionadas foram realizadas utilizando a estratégia *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE), que permite a distribuição dos múltiplos parâmetros em duas dimensões considerando-se seus graus de similaridade e interação, com o pacote cytofkit2 no RStudio 4.1.1 (CHEN et al., 2016). Após a análise no programa FlowJo, as amostras foram concatenadas de acordo com os marcadores utilizados (rTNF1, rTNF2, TNF e IL-10) com o mesmo número de eventos e utilizadas para alimentar o cytofkit2. A identificação de *clusters* foi feita utilizando o FlowSom e um número máximo de 15 *clusters* foi estabelecido.

#### 4.9 Análises estatísticas

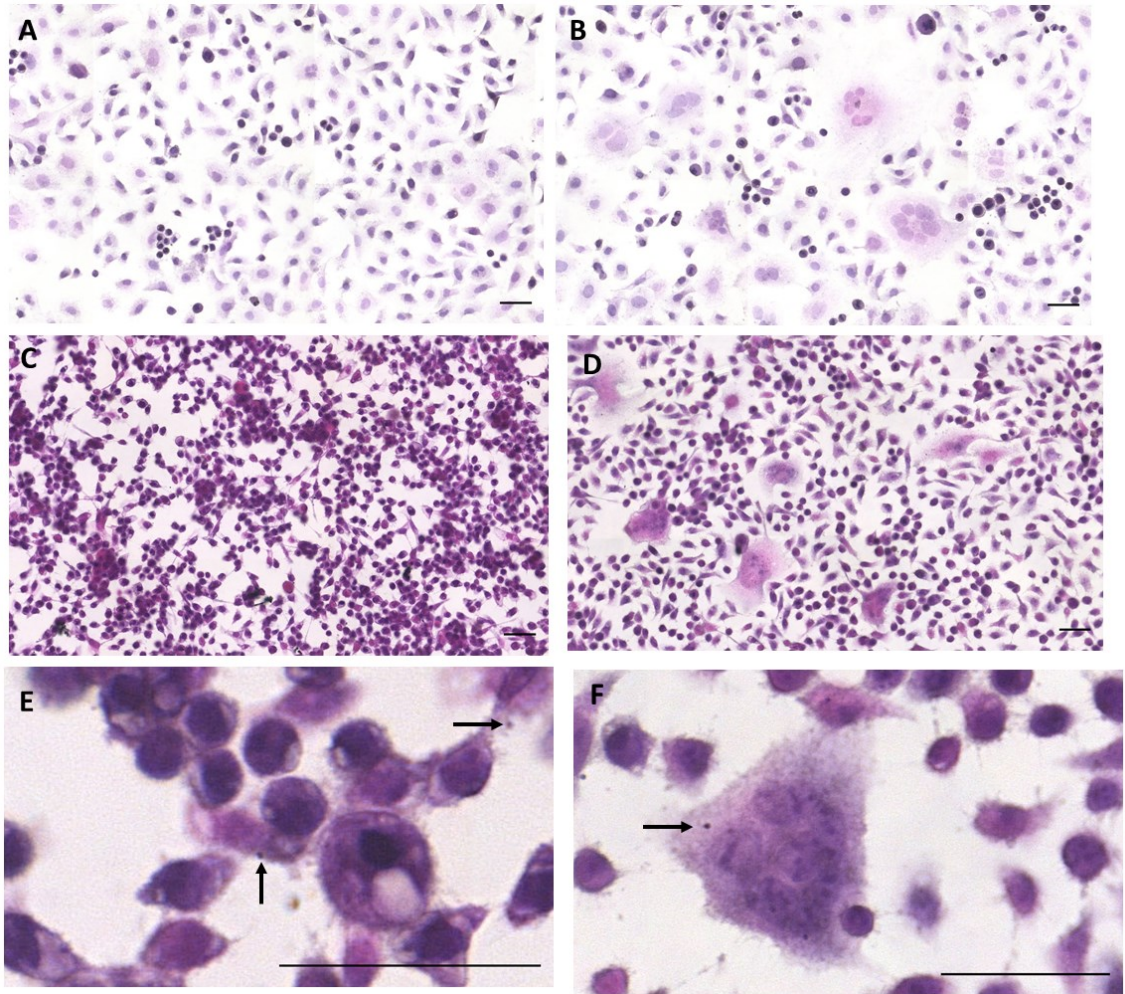
Devido ao fato de terem sido utilizadas uma linhagem celular, possuindo características genóticas e fenóticas homogêneas, os resultados foram considerados como apresentando distribuição normal. Com isso, foram realizados os testes t, com intervalo de confiança de 95%, e o teste One Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. As diferenças entre os dados foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ . Esses testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, EUA).

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Análise da infecção de células BeWo e SynBeWo pelas cepas Y ou 3253 na presença ou ausência de diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX) por coloração histológica**

#### **5.1.1 Comparação entre a infecção de células BeWo e SynBeWo não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de PTX**

Para determinar a infecção de células BeWo e SynBeWo por tripomastigotas das cepas Y e 3253 e os efeitos do tratamento com PTX na infecção das células, foram contadas 200 células de cada lâmina, em três campos distintos, realizada a contagem de amastigotas por célula e determinada a porcentagem de células infectadas. Em células SynBeWo, foi contado o número de parasitos por núcleo. A figura 3 apresenta as células BeWo não sincicializadas, apresentando um único núcleo (Figura 3A, C e E); células BeWo sincicializadas, apresentando múltiplos núcleos (3B, D e F); e amastigotas das cepas Y ou 3253 infectando células BeWo sincicializadas ou não (3C-F, setas).

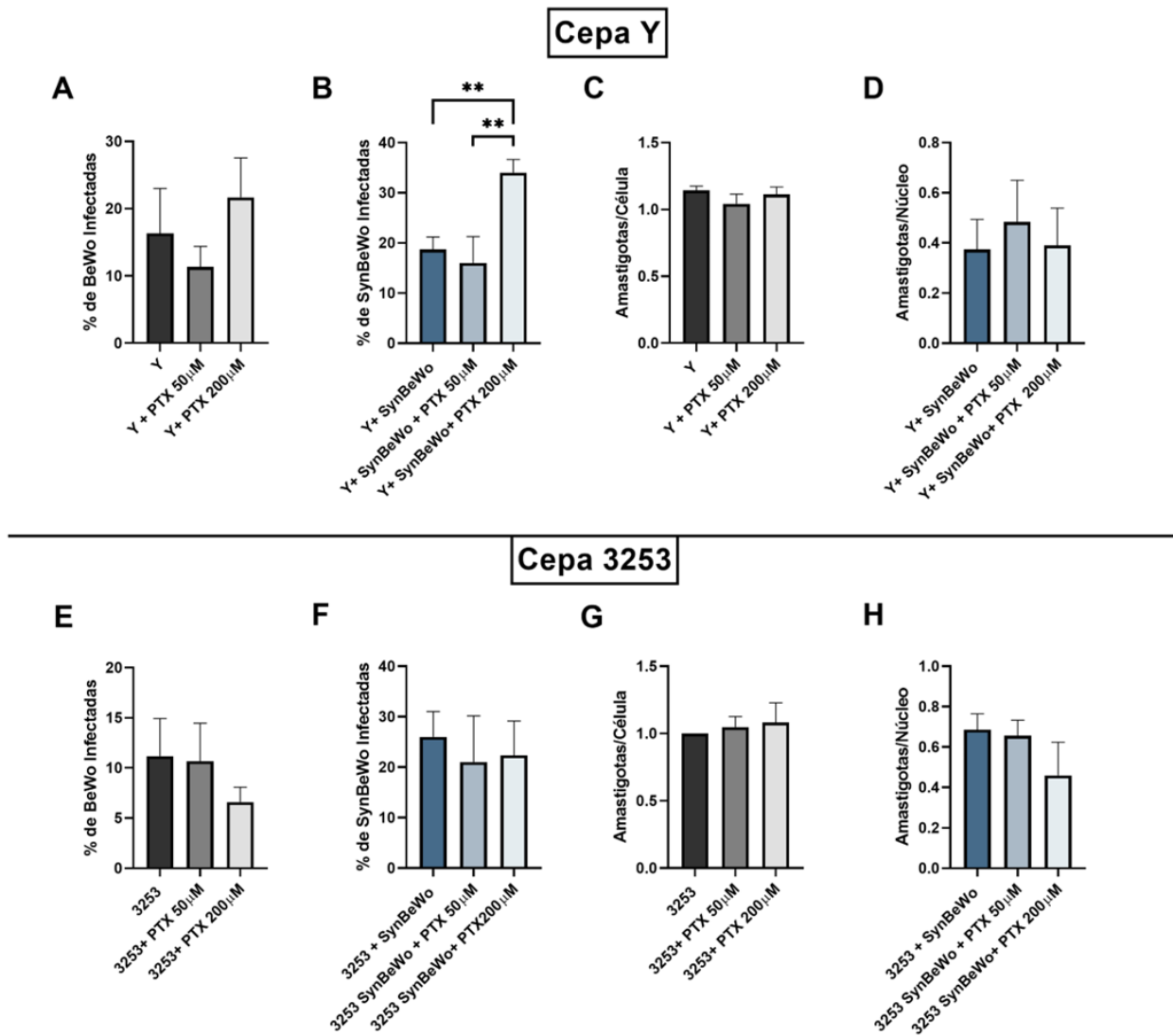


**Figura 3- Imagens representativas de células BeWo e células BeWo sincializadas (SynBeWo) infectadas ou não pelas cepas 3253 e Y de *T. cruzi*.** As células foram semeadas em placas de 24 poços e coradas com Hematoxilina e Eosina. Células SynBeWo foram obtidas após exposição a 8-br-cAMP por 48 horas. (A) células BeWo e (B) SynBeWo não infectadas; Células BeWo (C) e SynBeWo (D) infectadas; (E e F) Aumento maior mostrando amastigotas de *T. cruzi*, indicados pelas setas pretas, no interior de células BeWo (E) ou SynBeWo (F). Barra = 50 $\mu$ m.

Os dados obtidos como descrito acima foram quantificados para determinação da porcentagem e intensidade de infecção pelas diferentes cepas sob as diferentes condições.

A porcentagem de infecção pela cepa Y em células SynBeWo foi maior quando tratadas com 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas. A infecção foi significativamente maior do que em células SynBeWo não tratadas com PTX e em células SynBeWo tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (Figura 4B). Não houve diferença na porcentagem de células não sincializadas infectadas (Figura 4A) ou na quantidade de parasitos por célula comparando-se os diferentes tratamentos (Figura 4C e D). Já para a cepa 3253, a porcentagem de células BeWo ou SynBeWo infectadas não foi significativamente afetada pelas concentrações de PTX. A quantidade de parasitos por célula também não apresentou diferenças significativas (Figura 4E-H).



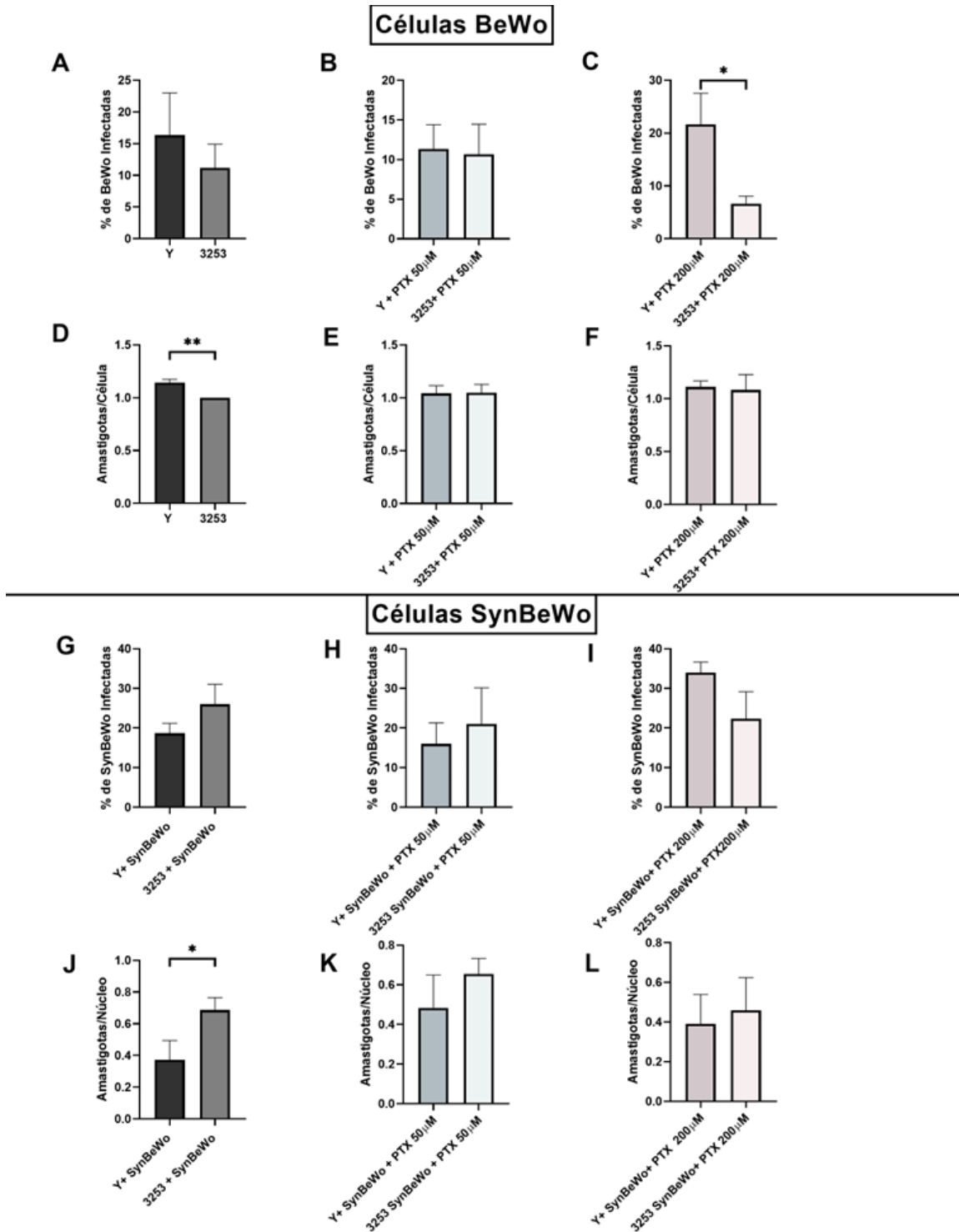


**Figura 4- Avaliação dos efeitos da pentoxifilina (PTX) na infecção de células BeWo e SynBeWo pelas cepas Y ou 3253.** As amostras foram tratadas com 50 ou 200  $\mu$ M de PTX por um período de 16 horas. (A) Porcentagem de células BeWo infectadas por Y quando não tratadas ou tratadas com as diferentes concentrações de PTX; (B) Porcentagem de células SynBeWo infectadas por Y quando não tratadas ou tratadas com as diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade de infecção de células BeWo pela cepa Y, medida pela quantidade de amastigotas por célula; (D) Intensidade de infecção de células SynBeWo pela cepa Y, medida pela quantidade de amastigotas por núcleo. (E) Porcentagem de células BeWo infectadas por 3253 quando não tratadas ou tratadas com as diferentes concentrações de PTX; (F) Porcentagem de células SynBeWo infectadas por 3253 quando não tratadas ou tratadas com as diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade de infecção de células BeWo pela cepa 3253, medida pela quantidade de amastigotas por célula; (H) Intensidade de infecção de células SynBeWo pela cepa 3253, medida pela quantidade de amastigotas por núcleo. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \*\* indica  $p < 0.01$ . As comparações foram realizadas com teste One-Way ANOVA.

### **5.1.2 Comparação entre a infecção pela cepa Y e pela cepa 3253 de células BeWo e SynBeWo submetidas ou não aos diferentes tratamentos com PTX**

Comparando a infecção pelas cepas Y e 3253 em células BeWo não sincicializadas, não houve diferença significativa entre a porcentagem de infecção de células BeWo não tratadas com PTX ou entre as tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (Figura 5A e B). Porém, a porcentagem de células BeWo infectadas com cepa Y foi significativamente maior do que as infectadas com 3253, quando tratadas com 200 $\mu$ M de PTX (Figura 5C). A intensidade de infecção de células BeWo infectadas com Y não tratadas foi maior do que as infectadas com 3253 (Figura 5D). Não houve diferença na intensidade de infecção comparando-se as cepas em células submetidas aos diferentes tratamentos (Figura 5E e F).

Em relação à porcentagem de infecção de SynBeWo, não observou-se diferença entre as cepas em células tratadas e não tratadas (Figura 5G-I). A razão parasito/núcleo da cepa 3253 foi significativamente maior do que as da cepa Y, quando não houve tratamento com PTX (Figura 5J). Em células tratadas com PTX, não observaram-se diferenças significativas na quantidade de amastigotas por núcleo (Figura 5K e L).

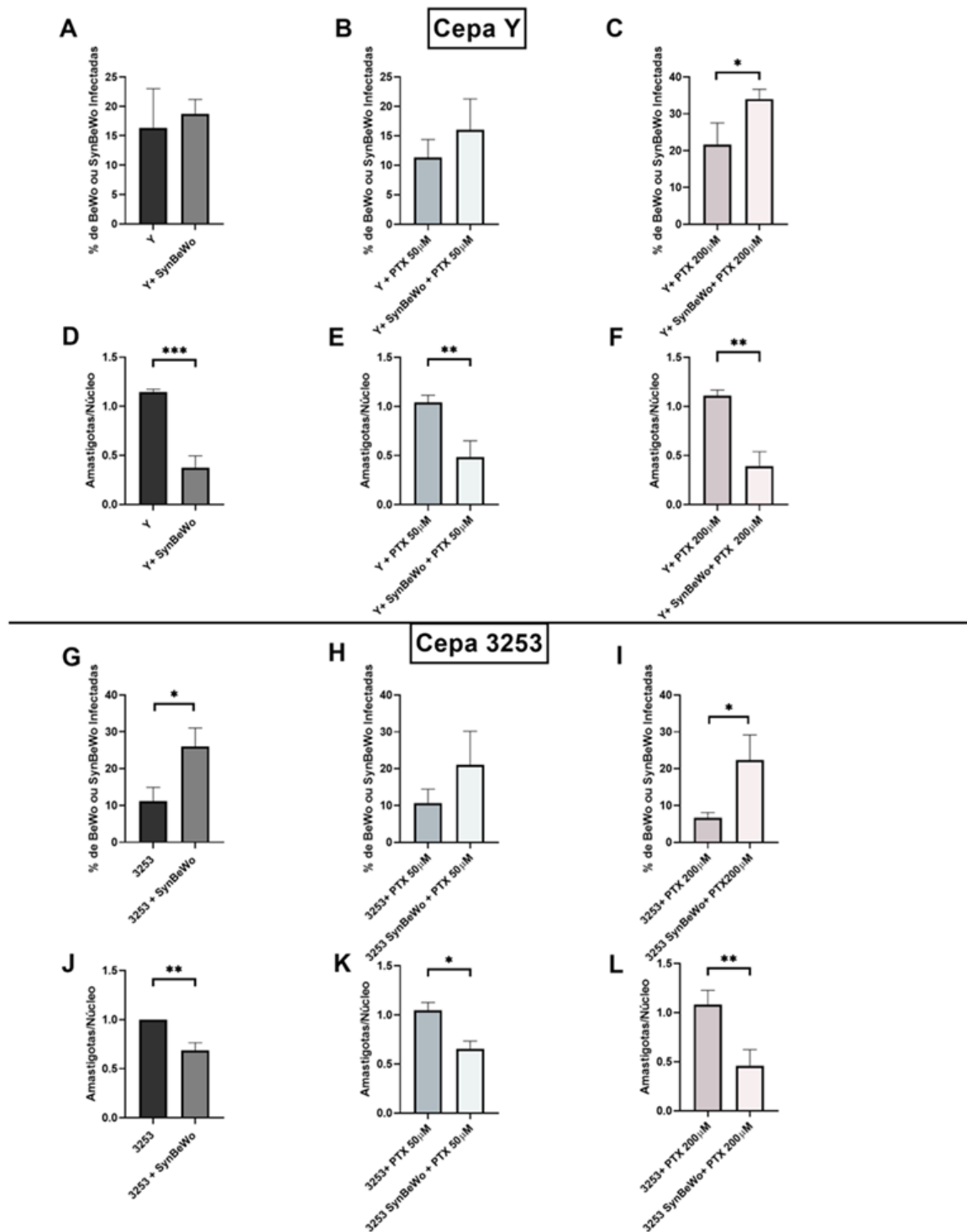


**Figura 5– Comparação entre a infecção pelas cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* em células BeWo e SynBeWo não tratadas ou tratadas com diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX).** As amostras foram tratadas com 50 ou 200µM de PTX por um período de 16 horas. (A) Porcentagem de células BeWo infectadas pelas cepas Y ou 3253; (B) Porcentagem de células infectadas quando tratadas com 50µM ou (C) 200µM de PTX; (D) Intensidade de infecção, medida pela quantidade de amastigotas por célula; (E) Intensidade de infecção em células tratadas com 50µM ou (F) 200µM de PTX. (G) Porcentagem de células SynBeWo infectadas pelas cepas Y ou 3253; (H) Porcentagem de células infectadas quando tratadas com 50µM ou (I) 200µM de PTX; (J) Intensidade de infecção, medida pela quantidade de amastigotas por núcleo; (K) Intensidade de infecção em células tratadas com 50µM ou (L) 200µM de PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste t não pareado; símbolos \* e \*\* indicam  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ ,

### **5.1.3 Comparação entre a infecção de células BeWo e de células SynBeWo tratadas ou não com PTX pelas diferentes cepas**

Quando foi comparada a infecção entre células BeWo e SynBeWo, não observou-se diferença na porcentagem de infecção pela cepa Y em células não tratadas ou tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (Figura 6A e B); já as SynBeWo tratadas com 200 $\mu$ M de PTX apresentaram maior porcentagem de infecção do que BeWo (Figura 6C). Em todas as condições, a intensidade de infecção foi menor nas células SynBeWo comparando-se com as BeWo (Figura 6 D-F).

Células SynBeWo apresentaram maior porcentagem de infecção pela cepa 3253 quando não tratadas ou quando tratadas com 200 $\mu$ M de PTX do que células BeWo (Figura 6G e I). Elas apresentaram, porém, menor intensidade de infecção, em todas as condições (Figura 6J-L).

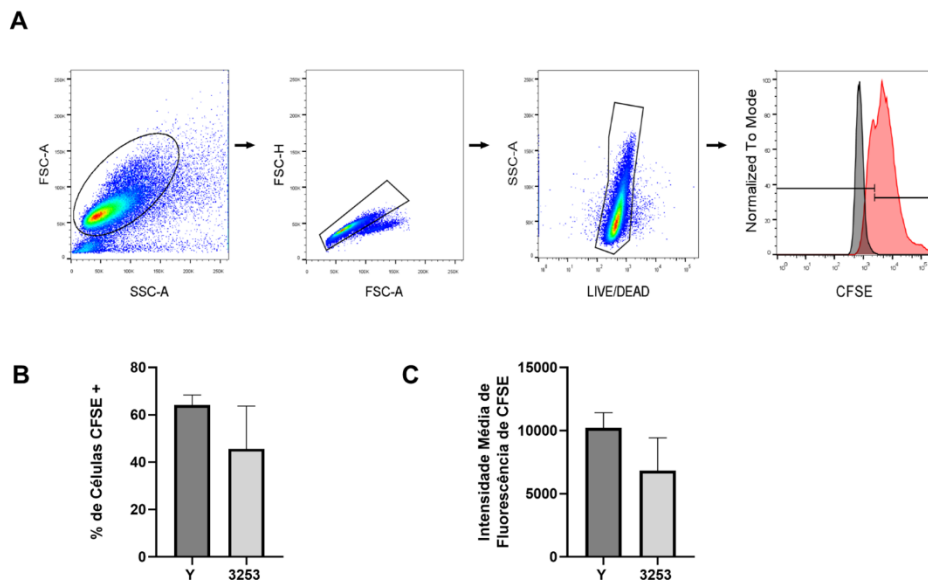


**Figura 6- Comparação entre a infecção pela cepa 3253 em células BeWo e SynBeWo tratadas com diferentes concentrações de pentoxifilina (PTX).** As amostras foram tratadas com 50 ou 200 μM de PTX por um período de 16 horas. (A) Porcentagem de infecção de BeWo ou SynBeWo pela cepa Y; (B) Porcentagem de infecção quando tratadas com 50 μM ou (C) 200 μM de PTX; (D) Intensidade de infecção, medida pela quantidade de amastigotas por núcleo; (E) Intensidade de infecção quando tratadas com 50 μM ou (F) 200 μM de PTX. (G) Porcentagem de infecção de BeWo ou SynBeWo pela cepa 3253; (H) Porcentagem de infecção quando tratadas com 50 μM ou (I) 200 μM de PTX; (J) Intensidade de infecção, medida pela quantidade de amastigotas por núcleo; (K) Intensidade de infecção quando tratadas com 50 μM ou (L) 200 μM de PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Os símbolos \*, \*\* e \*\*\* indicam  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente. As comparações foram realizadas utilizando o teste t não pareado.

## 5.2 Avaliação da infecção, expressão de citocinas e de receptores de TNF por citometria de fluxo

### 5.2.1 As cepas Y e 3253 de *T. cruzi* infectam células BeWo de maneira similar

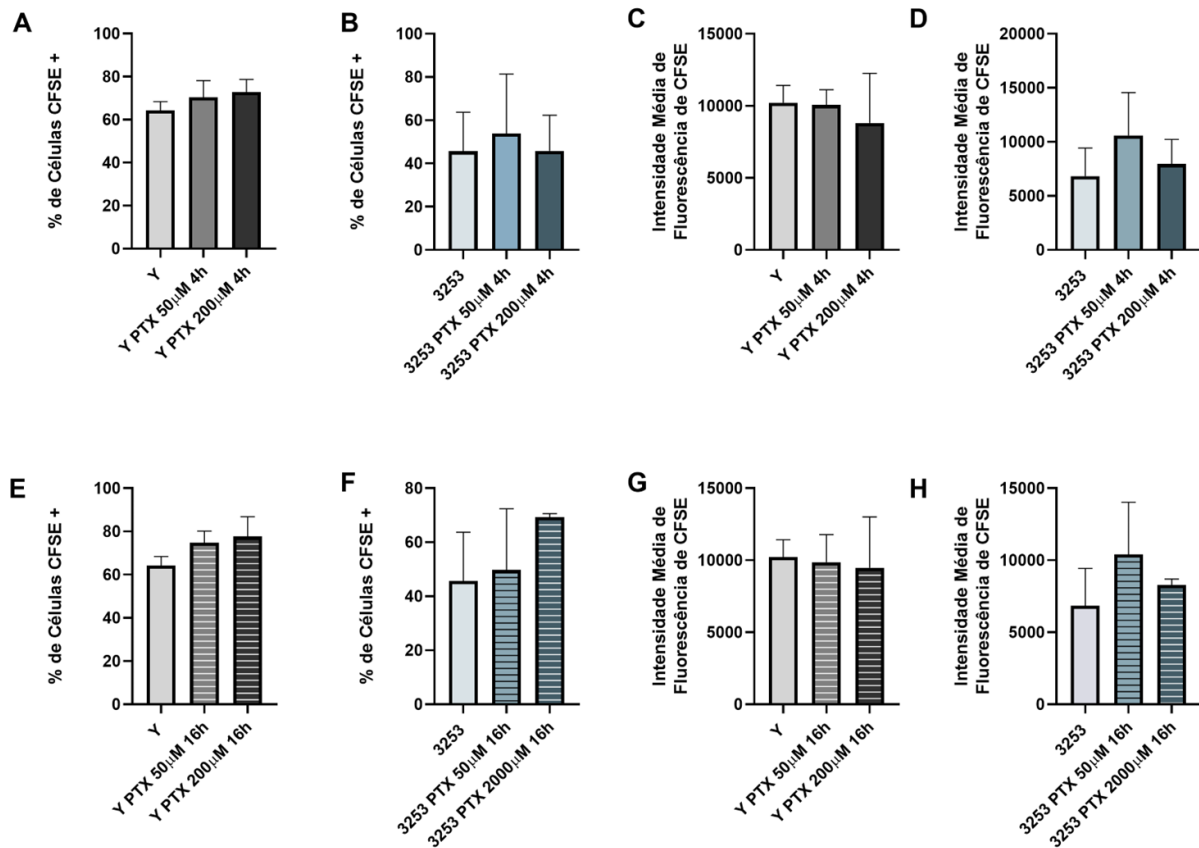
Quando a infecção pelas cepas Y e 3253 foi comparada, não houve diferença estatística significativa entre a porcentagem de células BeWo infectadas, medida pela porcentagem de células CFSE+, ou intensidade de infecção, medida através da intensidade média de fluorescência de CFSE (Figura 7).



**Figura 7 – Comparação entre a infecção pelas cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* em células BeWo.** As células foram expostas a tripomastigotas corados com CFSE por 3 horas. (A) Estratégia de análise utilizada. As populações de BeWo foram selecionadas primeiramente utilizando tamanho (FSC-A) x granulidade (SSC-A) (primeiro painel). Em seguida, foram selecionados os *singlets* de células utilizando altura (FSC-H) x área (FSC-A) (segundo painel), e então as células mortas foram excluídas utilizando SSC x LIVE/DEAD (terceiro painel). Células CFSE+ e CFSE- (em vermelho) foram identificadas utilizando células não expostas ao parasito como controle (em cinza, quarto painel). (B) Porcentagem de células BeWo CFSE+ para as cepas Y ou 3253; (C) Intensidade média de fluorescência de CFSE em células BeWo. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste t não pareado. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### **5.2.2 O tratamento com PTX não altera a intensidade ou porcentagem de células BeWo CFSE+ infectadas com as cepas Y ou 3253**

A porcentagem de células BeWo infectadas com parasitos da cepa Y ou 3253 e não tratadas, tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas foi semelhante em todas essas condições, o mesmo ocorrendo com a intensidade de infecção (Figuras 8A, B, C e D). O tratamento com PTX por 16 horas, em concentrações de 50 $\mu$ M e 200 $\mu$ M, também não alterou a porcentagem e intensidade de infecção de células BeWo por parasitos da cepa Y (Figuras 8E e G), ou 3253 (Figuras 8F e H) em comparação com as não tratadas.



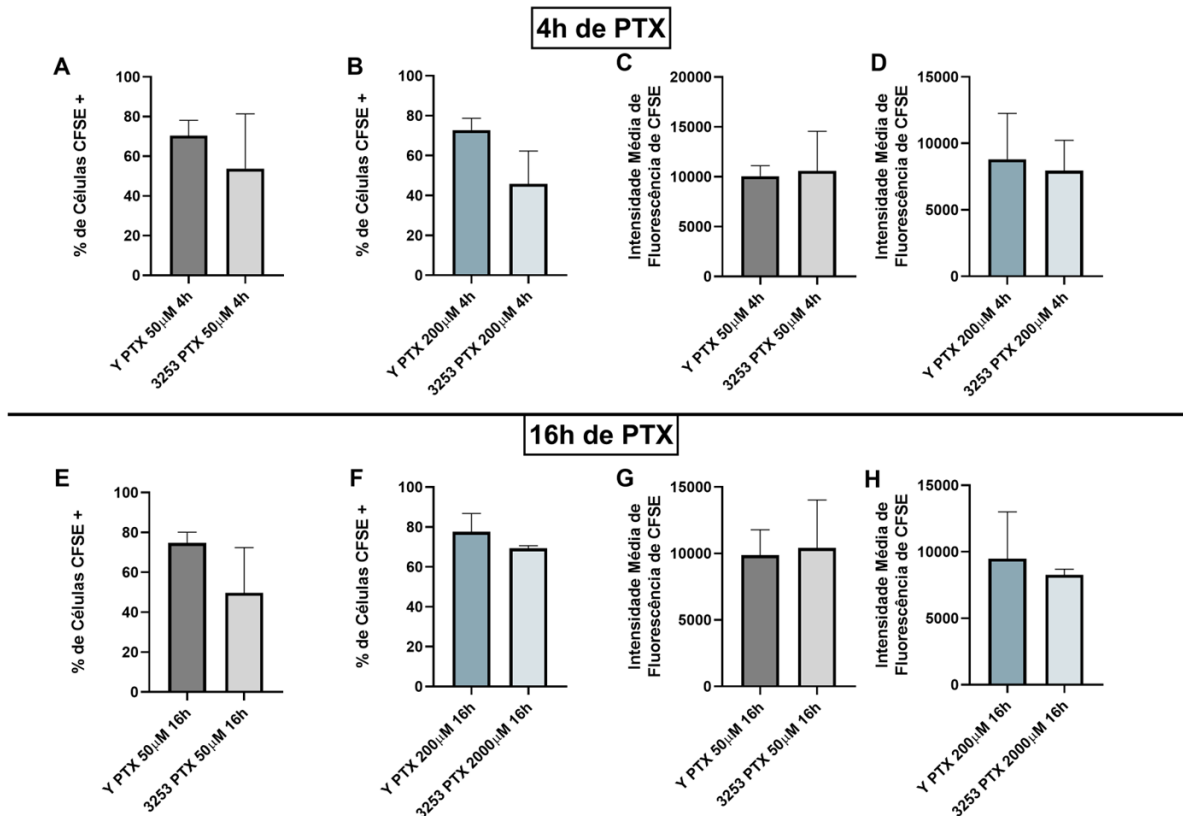
**Figura 8– Comparação da infecção pelas cepas Y ou 3253 entre os diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).**

Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. As células foram expostas a 50 μM ou 200 μM de PTX uma hora antes e durante as 3 horas de infecção pelo parasito, totalizando 4 horas de tratamento; ou por uma hora antes, durante as 3 horas de infecção e durante o restante do período de incubação, totalizando 16 horas de tratamento. (A) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y tratadas por 4 horas com PTX; (B) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa 3253 tratadas por 4 horas com PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de células CFSE+ para a cepa Y e tratadas por 4 horas de PTX; (D) Intensidade média de fluorescência de células CFSE+ para a cepa 3253 e tratadas com 4 horas de PTX; (E) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y tratadas por 16 horas com PTX; (F) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa 3253 tratadas por 16 horas com PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de células CFSE+ para a cepa Y e tratadas com 16 horas de PTX; (H) Intensidade média de fluorescência de células CFSE+ para a cepa 3253 e tratadas com 16 horas de PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



### 5.2.3 A infecção com os diferentes isolados não é diferentemente afetada pela PTX

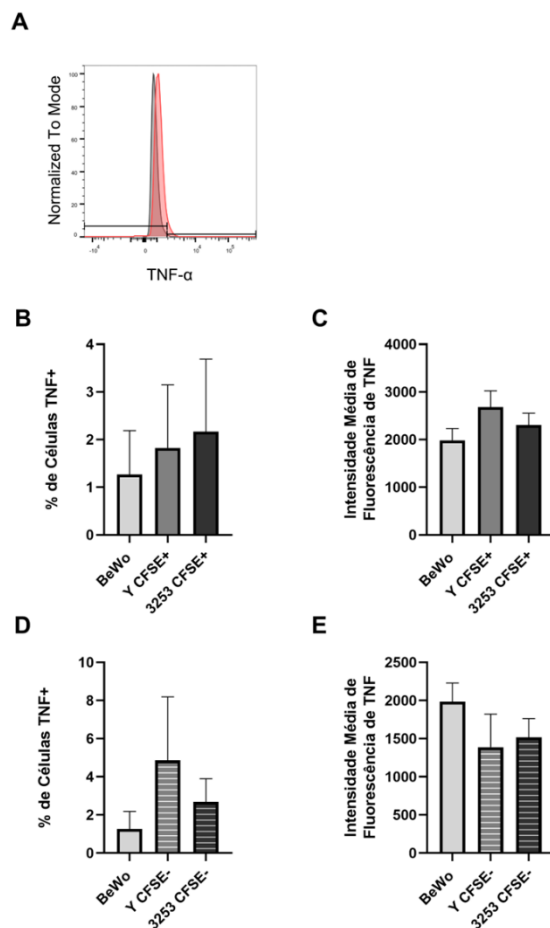
Quando comparadas as porcentagens e intensidade de infecção das células BeWo entre as duas cepas com os diferentes tratamentos, não houve diferenças significativas em nenhuma das condições. As cepas Y e 3253 infectaram quantidades similares de células BeWo quando submetidas ao tratamento com 50 $\mu$ M de PTX por 4 ou 16 horas (Figura 9A e E); o mesmo ocorreu para a intensidade de infecção (Figura 9C e G). A porcentagem e intensidade de infecção entre as duas cepas também foi similar quando as células foram submetidas ao tratamento com 200 $\mu$ M de PTX por 4 ou 16 horas (Figuras 9B, D, F e H).



**Figura 9- Comparação entre a infecção pelas cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* com os diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).** Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. As células foram expostas a 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX uma hora antes e durante as 3 horas de infecção pelo parasito, totalizando 4 horas de tratamento, ou por uma hora antes, durante as 3 horas de infecção e durante o restante do periodo de incubação, totalizando 16 horas de tratamento. (A) Porcentagem de células CFSE+ tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (B) 200 $\mu$ M de PTX infectadas pelas cepas Y ou 3253; (C) Intensidade média de fluorescência de CFSE em células tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (D) 200 $\mu$ M de PTX infectadas pelas cepas Y ou 3253; (E) Porcentagem de células CFSE+ tratadas por 16 horas com 50 $\mu$ M ou (F) 200 $\mu$ M de PTX de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de CFSE em células tratadas por 16 horas com 50 $\mu$ M ou (H) 200 $\mu$ M de PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste t não pareado. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.4 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento da expressão de TNF em células BeWo

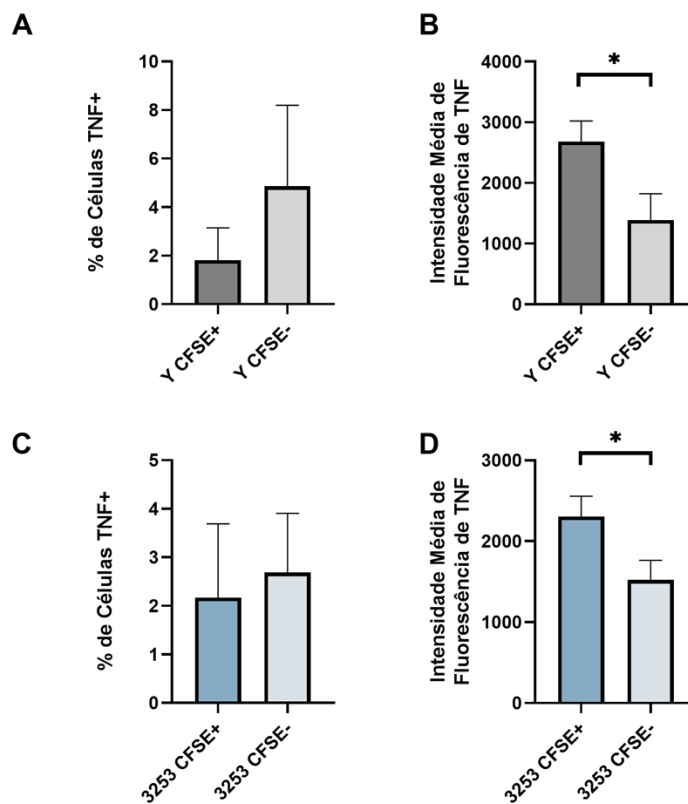
Quando comparadas a intensidade e porcentagem de expressão da citocina TNF, células BeWo infectadas com as cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* (células CFSE+) apresentaram porcentagem e intensidade de expressão de TNF semelhantes às de células BeWo não infectadas, embora observou-se uma tendência de aumento da expressão desta citocina em células infectadas (Figuras 10B e C). O mesmo ocorreu para as células BeWo expostas ao parasito, mas não infectadas (células CFSE-, Figuras 10D e E).



**Figura 10– Avaliação da expressão de TNF em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253 de *T. cruzi*.** Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Estratégia de análise utilizada. Foram utilizadas células não marcadas como controle (em cinza) para determinar as populações TNF+ (em vermelho). (B) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e células CFSE+ para a cepa 3253 TNF+; (C) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo e células CFSE+ para Y ou 3253; (D) Porcentagem de células BeWo e células CFSE – para 3253 ou Y TNF+; (E) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo e células CFSE- para Y ou 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.5 Células BeWo expostas aos parasitos, mas não infectadas exibem menor intensidade de expressão de TNF que células infectadas com as cepas Y ou 3253

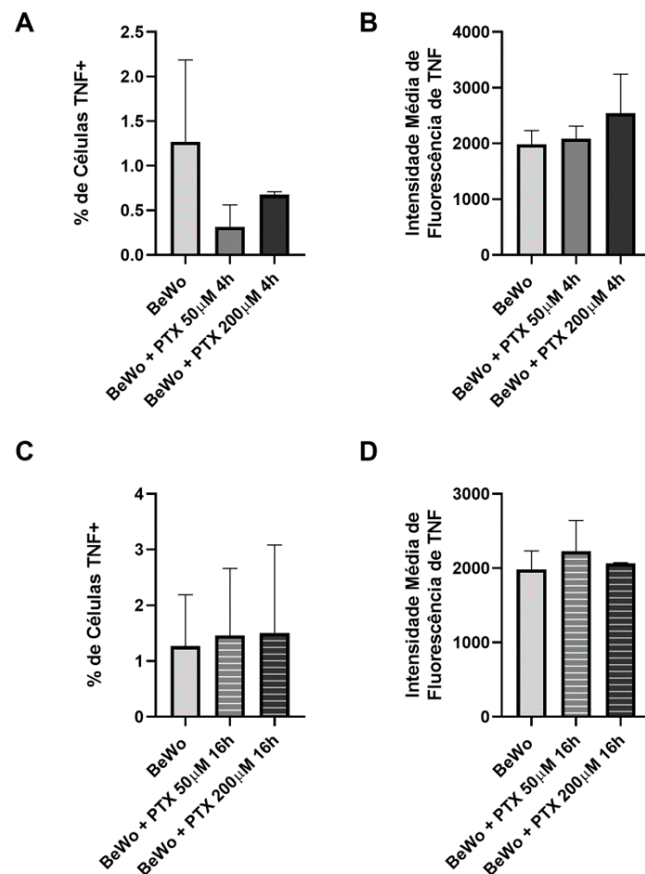
Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de TNF entre células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa Y, observou-se que não houve diferença na porcentagem de expressão de TNF (Figura 11 A), mas que as células infectadas exibiram maior intensidade de expressão de TNF (Figura 11B). O mesmo ocorreu entre as células CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253 (Figura 11 C e D).



**Figura 11 – Comparação da expressão de TNF entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas as cepas Y ou 3253.** Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo TNF+ em células CFSE+ e CFSE- para a cepa Y; (B) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa Y; (C) Porcentagem de células BeWo TNF+ em células CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253; (D) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* indica  $p < 0.05$ . As comparações foram realizadas utilizando o teste t não pareado. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.6 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou porcentagem de expressão de TNF em células BeWo

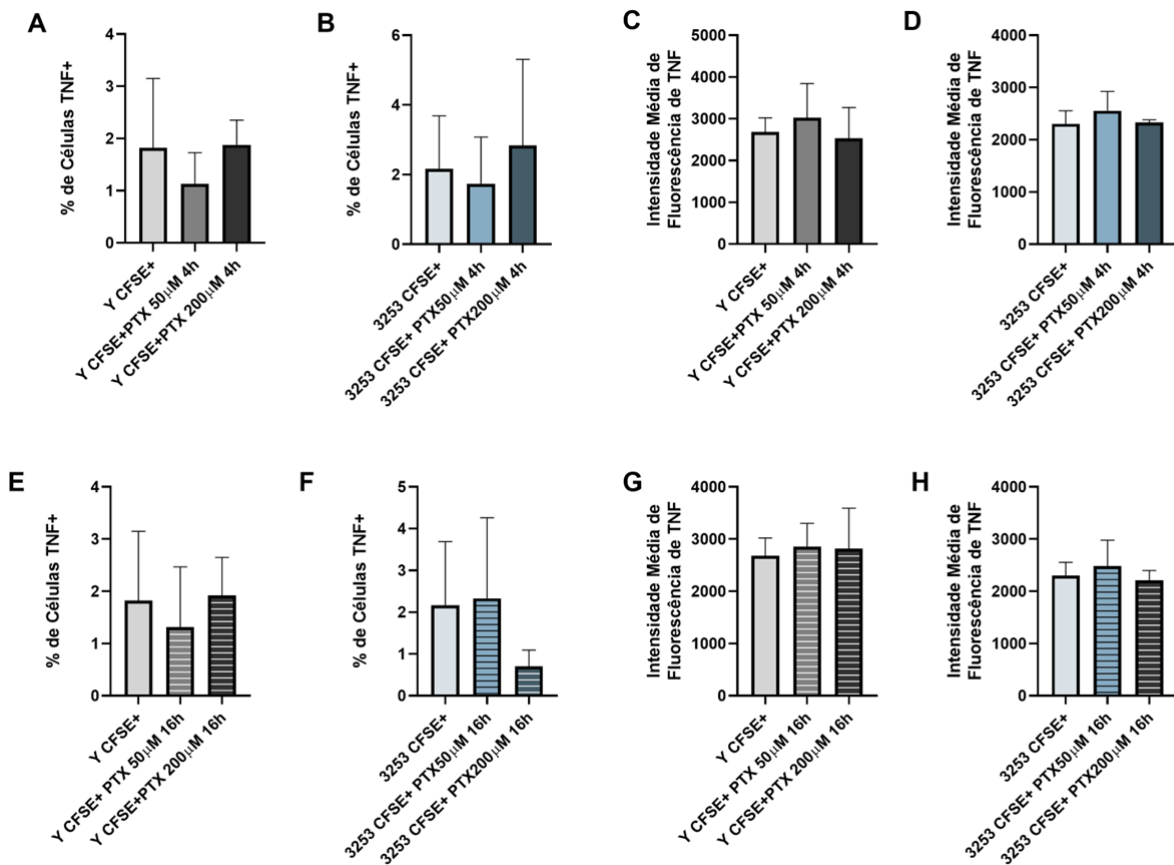
Nós avaliamos se o uso da PTX afeta a expressão de TNF em células BeWo não expostas aos parasitos. Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão da citocina, não houve diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos com PTX. A porcentagem e a intensidade de expressão foram semelhantes em células não tratadas e em células tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas (Figuras 12 A e B). O mesmo ocorreu para a porcentagem e intensidade em células não tratadas e tratadas por 16 horas com PTX (Figuras 12C e D).



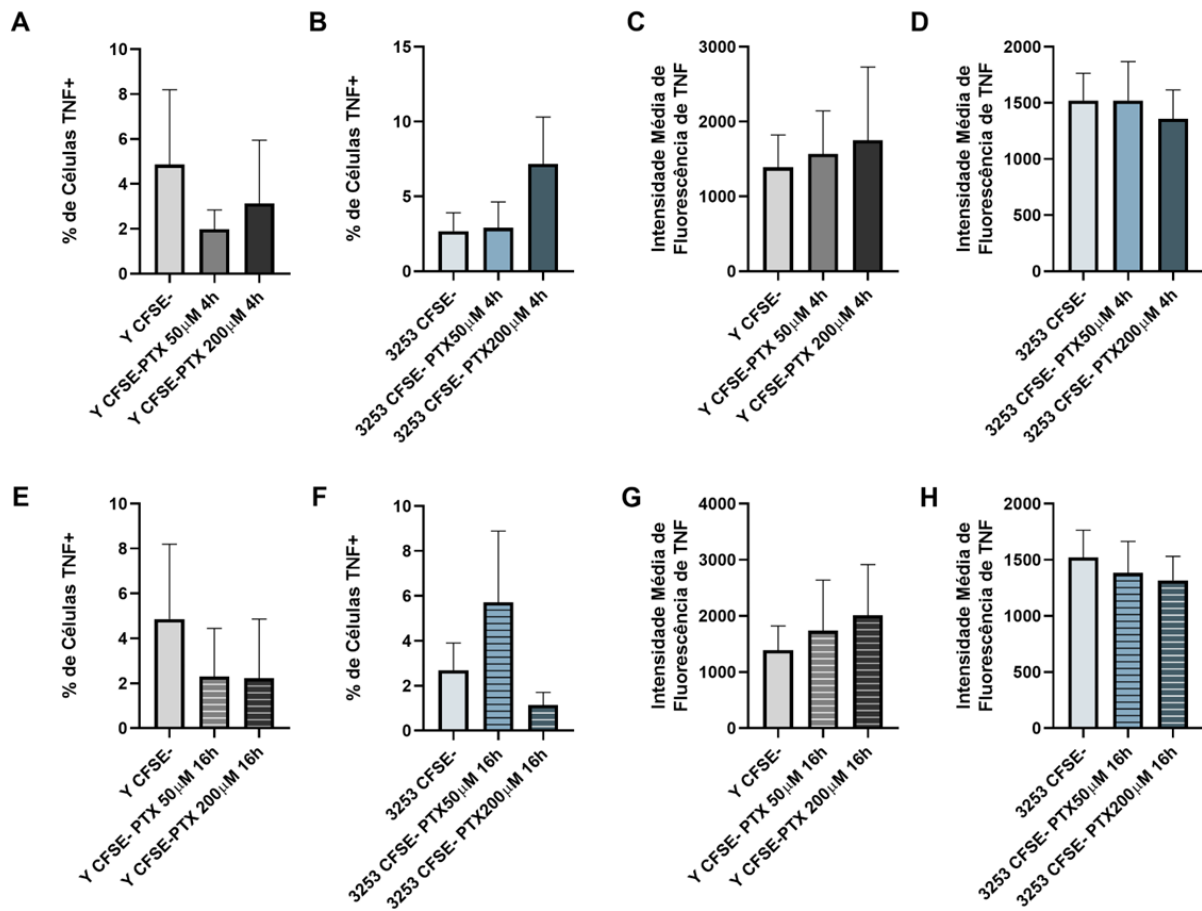
**Figura 12 – Avaliação da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. (A) Porcentagem de células BeWo TNF+ tratada por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (B) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo tratadas por 4 horas com PTX; (C) Porcentagem de células BeWo TNF+ tratada por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (D) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.7 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou porcentagem de expressão de TNF em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253

Em seguida, avaliamos se o uso da PTX altera a expressão de TNF em células infectadas com as diferentes cepas. Observou-se que não houve diferenças significativas na intensidade e porcentagem de expressão de TNF entre os diferentes tratamentos com PTX em células CFSE+ (Figura 13) ou em células CFSE- (Figura 14) para as cepas Y ou 3253, em comparação com células não tratadas.



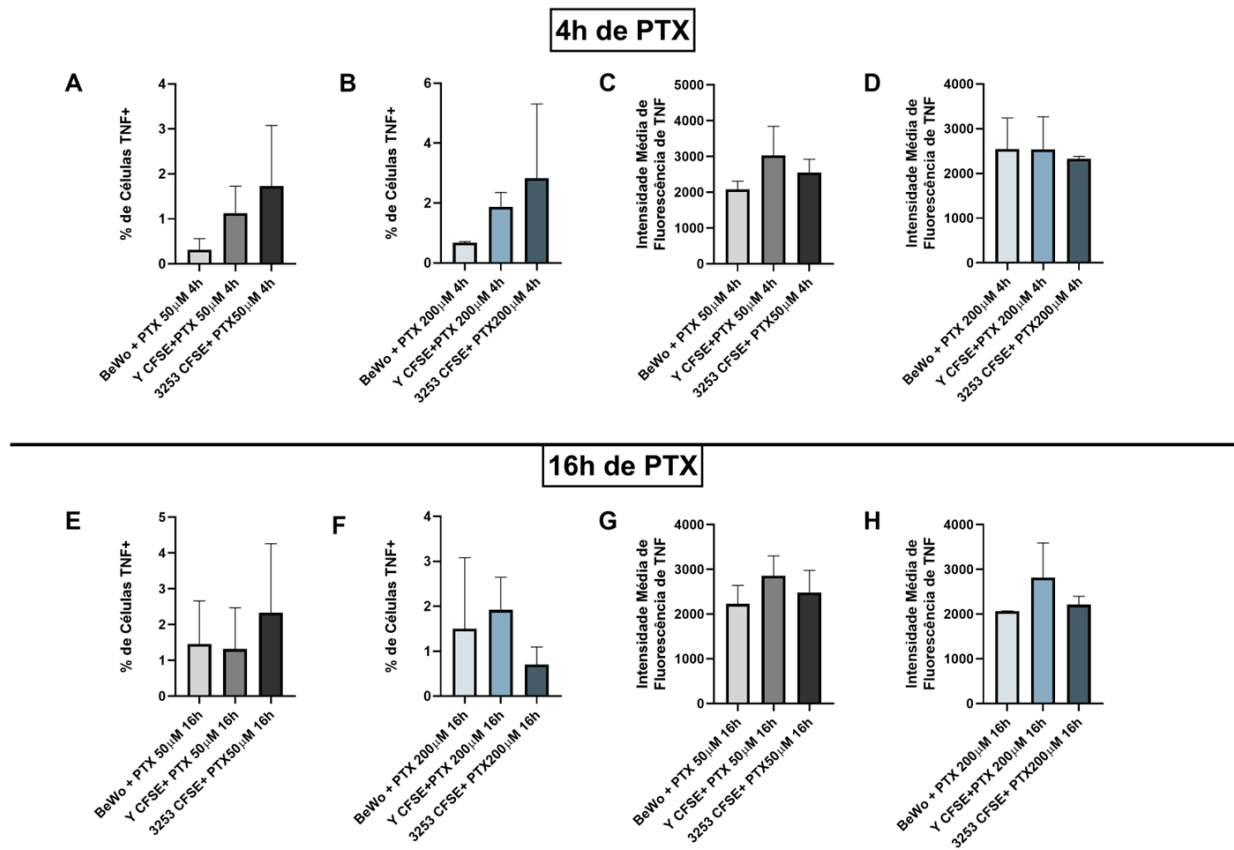
**Figura 13 – Avaliação da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50 μM ou 200 μM de PTX por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (B) 3253 TNF+, tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de TNF em células CFSE+ para a cepa Y ou (D) 3253, tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (F) 3253 TNF+, tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de TNF em células CFSE+ para a cepa Y ou (H) 3253, tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



**Figura 14 – Avaliação da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50 μM ou 200 μM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (B) 3253 TNF+, tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de TNF em células CFSE- para a cepa Y ou (D) 3253 tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (F) 3253 TNF+, tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de TNF em células CFSE- para a cepa Y ou (H) 3253, tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

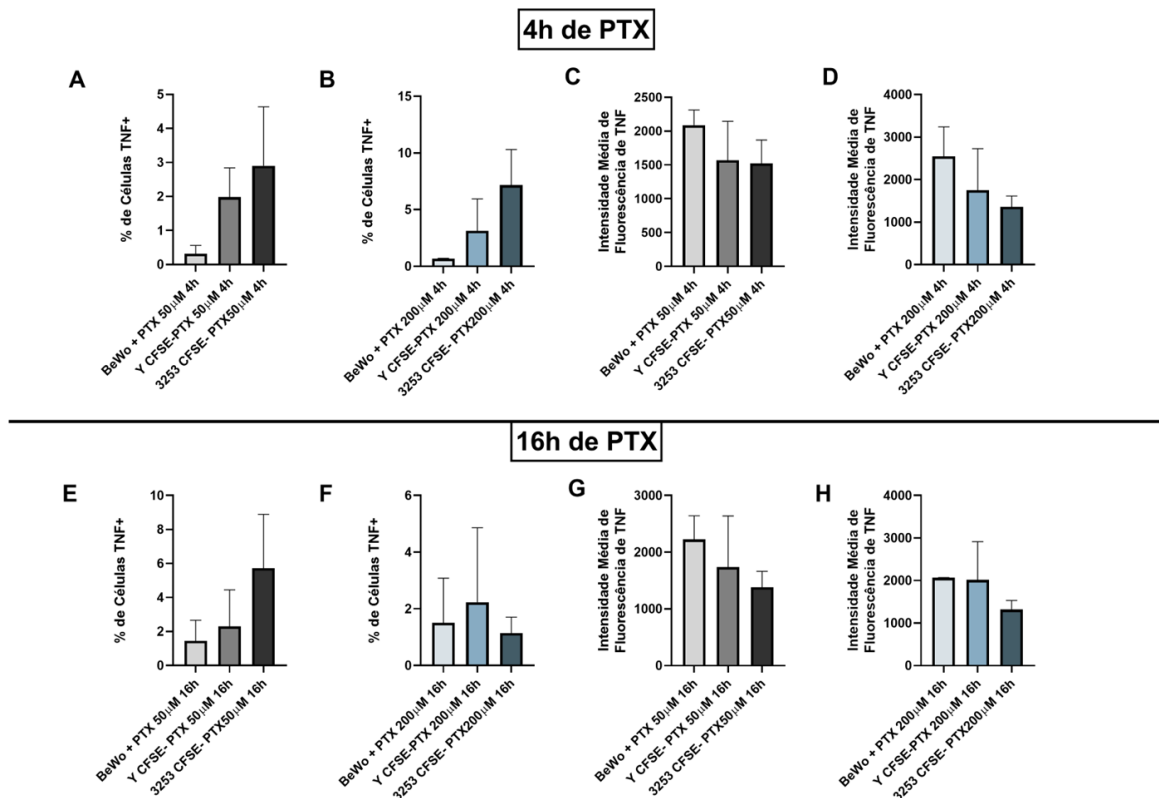
### **5.2. 8 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento da expressão de TNF em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com PTX**

Comparando-se entre BeWo CFSE+ para as duas cepas e BeWo não expostas, observou-se que intensidade e a porcentagem de expressão de TNF foi semelhante em células submetidas a 4 horas de tratamento com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX (Figuras 15 A-D). O mesmo ocorreu com as células tratadas por 16 horas com PTX (Figuras 15 E-H). Quando comparadas com as células CFSE- para as duas cepas, a intensidade e porcentagem de expressão de TNF em células BeWo não expostas e submetidas aos diferentes tratamentos com PTX também foi semelhante. (Figura 16).



**Figura 15 – Comparação da expressão de TNF entre células BeWo infectadas com as cepas Y e 3253 de *T. cruzi* e células não expostas aos parasitos, tratadas com pentoxifilina PTX.** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e para a cepa 3253 TNF+, tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (B) 200  $\mu$ M de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo e células CFSE+ tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (D) 200 $\mu$ M de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo e células CFSE+ TNF+, tratadas com 50 $\mu$ M ou (F) 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas; (G) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo e células CFSE+ tratadas por 16 horas com 50 $\mu$ M ou (H) 200 $\mu$ M de PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

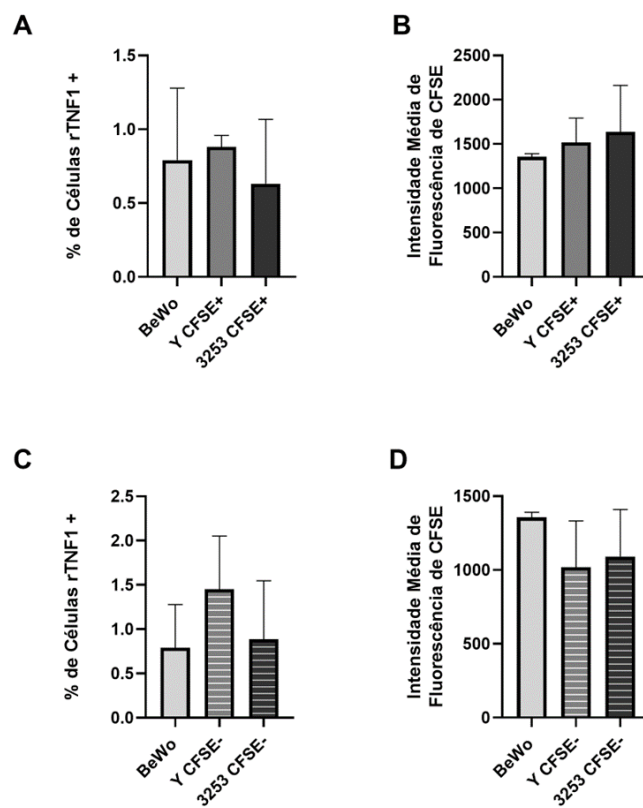




**Figura 16 – Comparação da expressão de TNF entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas e células expostas, mas não infectadas às cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* tratadas com pentoxifilina (PTX). As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE- para a cepa Y e para a cepa 3253 TNF+, tratadas por 4 horas com 50µM ou (B) 200µM de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo e células CFSE- tratadas por 4 horas com 50µM ou (D) 200µM de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo e células CFSE- TNF+, tratadas com 50µM ou (F) 200µM de PTX por 16 horas; (G) Intensidade média de fluorescência de TNF em células BeWo e células CFSE- tratadas por 16 horas com 50µM ou (H) 200 µM de PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.**

### 5.2.9 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento na expressão do receptor 1 de TNF (rTNF1) em células BeWo

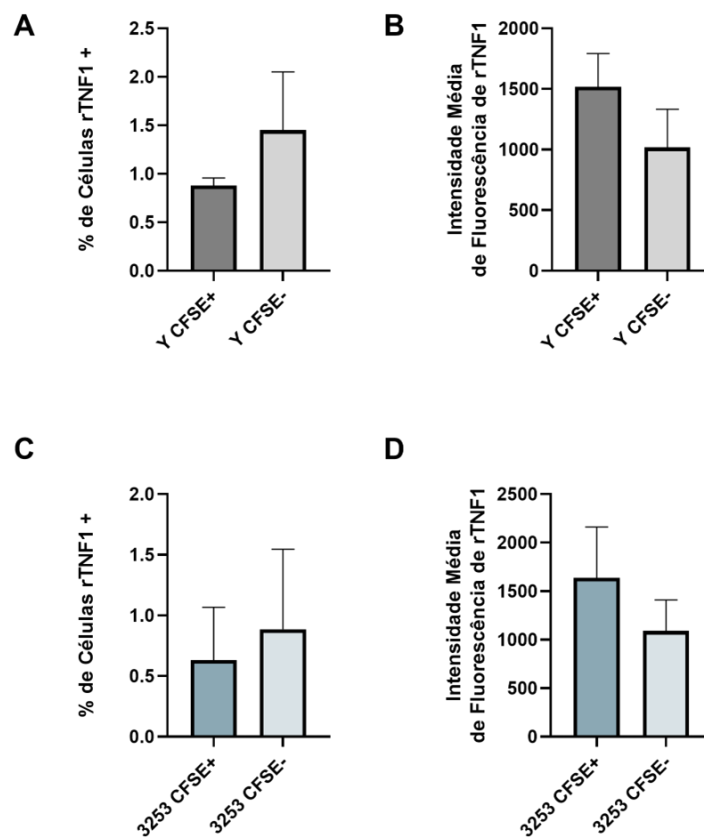
Em comparação com células BeWo não expostas aos parasitos, células CFSE+ e CFSE- para as duas cepas não apresentaram um aumento significativo da porcentagem ou intensidade de expressão de rTNF1 (Figura 17).



**Figura 17 – Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253 de *T. cruzi*. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e células CFSE+ para a cepa 3253 rTNF1+; (B) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo e células CFSE+ para Y ou 3253; (C) Porcentagem de células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253 rTNF1+; (D) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.**

### 5.2.10 A porcentagem e intensidade de expressão de rTNF1 não são significativamente diferentes em células BeWo infectadas e não infectadas, mas expostas aos parasitos

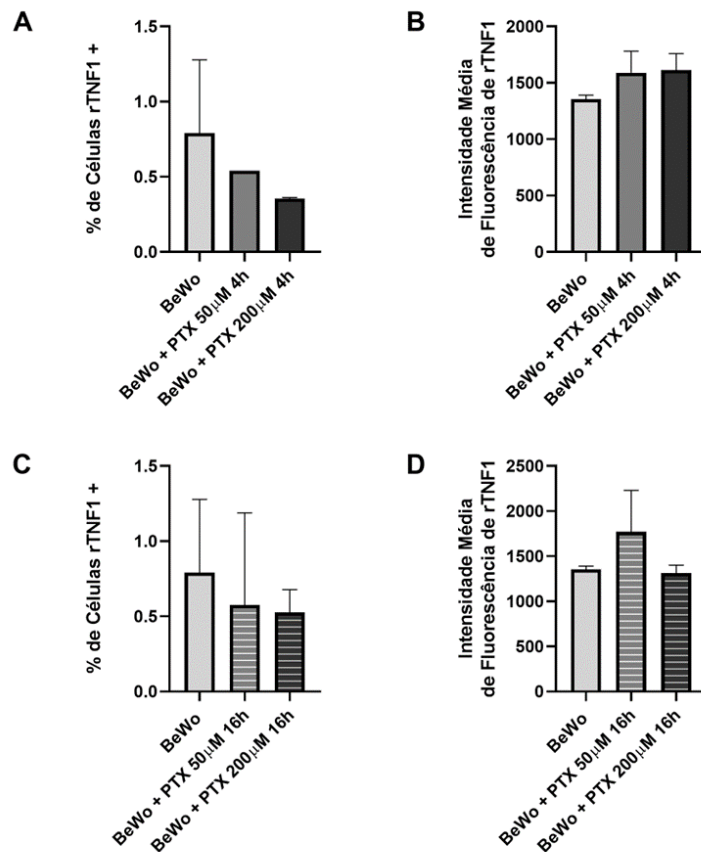
Quando comparadas, populações de BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa Y não apresentaram diferenças significativas para expressão ou intensidade de rTNF1 (Figuras 18A e B). O mesmo ocorre com as células CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253 (Figuras 18C e D).



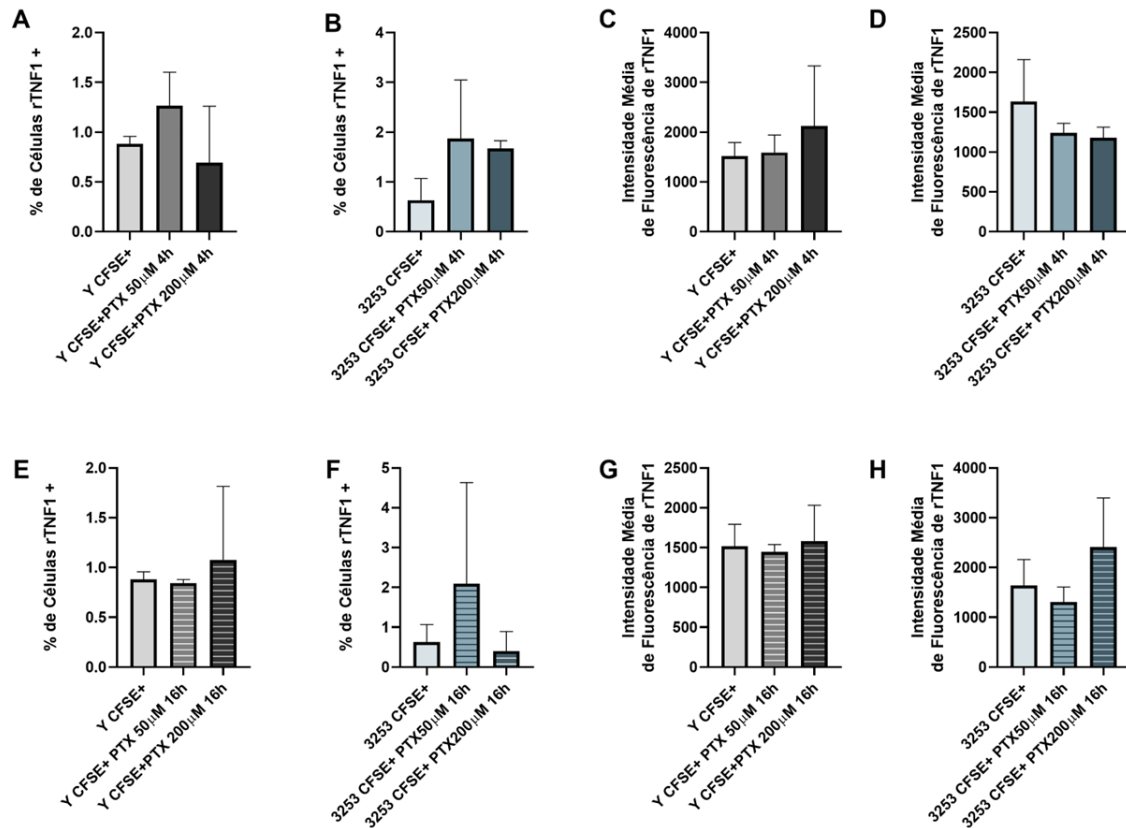
**Figura 18 – Comparação da expressão de rTNF1 entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas as cepas Y ou 3253. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A)** Porcentagem de células BeWo rTNF1+ em células CFSE+ e CFSE- para a cepa Y; (B) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa Y; (C) Porcentagem de células BeWo rTNF1+ em células CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253; (D) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste t não pareado. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.11 As diferentes durações de tratamento com diferentes concentrações de PTX não alteram a expressão de rTNF1 em células BeWo somente nem em células infectadas com as cepas Y ou 3253

Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de rTNF1 em células BeWo não expostas aos parasitos, não houve diferença entre os diferentes tratamentos com PTX. A porcentagem e a intensidade de expressão do receptor foram semelhantes em células não tratadas e tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas (Figuras 19A e B). O mesmo ocorreu para a porcentagem e intensidade em células tratadas por 16 horas (Figuras 19C e D). Não houve diferenças significativas na expressão de rTNF1 em células CFSE+ para as cepas Y ou 3253, tratadas com PTX (Figura 20).



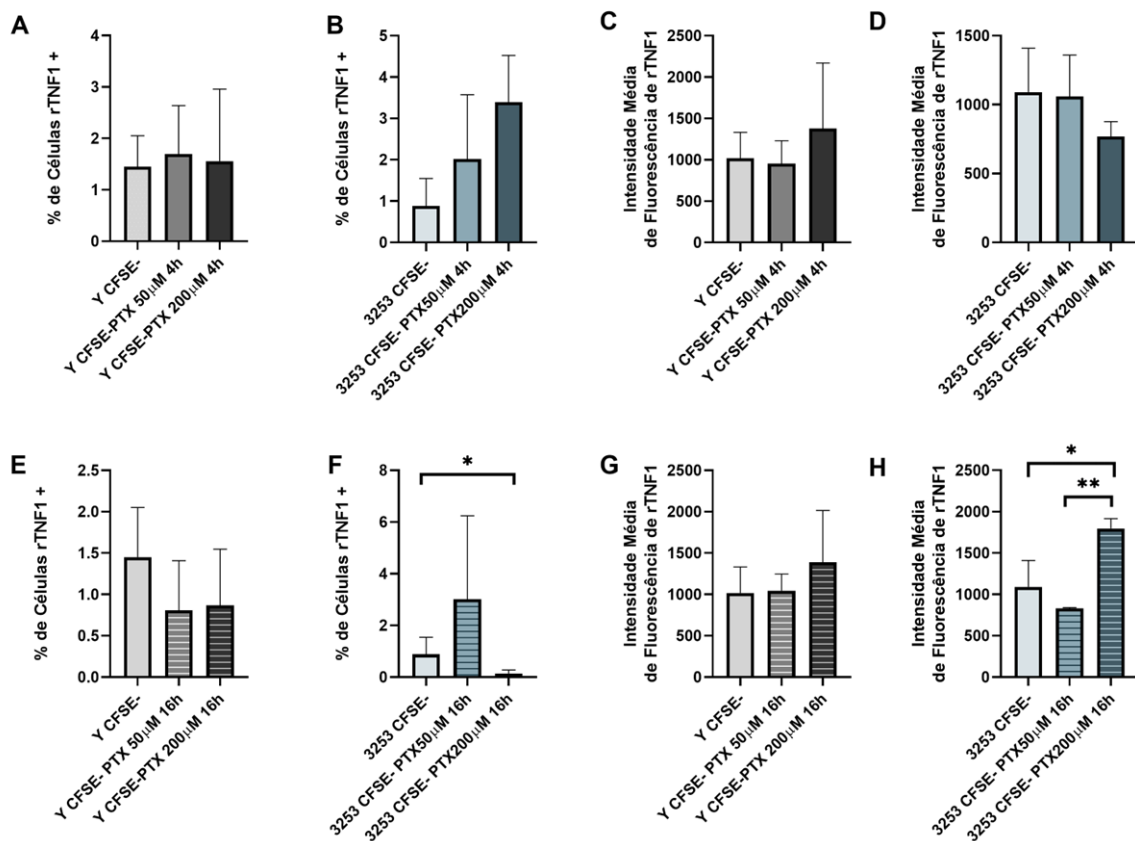
**Figura 19 -Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. (A) Porcentagem de células BeWo rTNF1+ tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (B) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo tratadas por 4 horas com PTX; (C) Porcentagem de células BeWo rTNF1+ tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (D) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



**Figura 20-Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50μM ou 200μM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (B) 3253 rTNF1+, tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células CFSE+ para a cepa Y ou (D) 3253, tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (F) 3253 rTNF1+, tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células CFSE+ para a cepa Y ou (H) 3253 tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.12 O tratamento com 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas diminui a porcentagem de expressão de rTNF1, mas aumenta sua intensidade em células expostas à cepa 3253

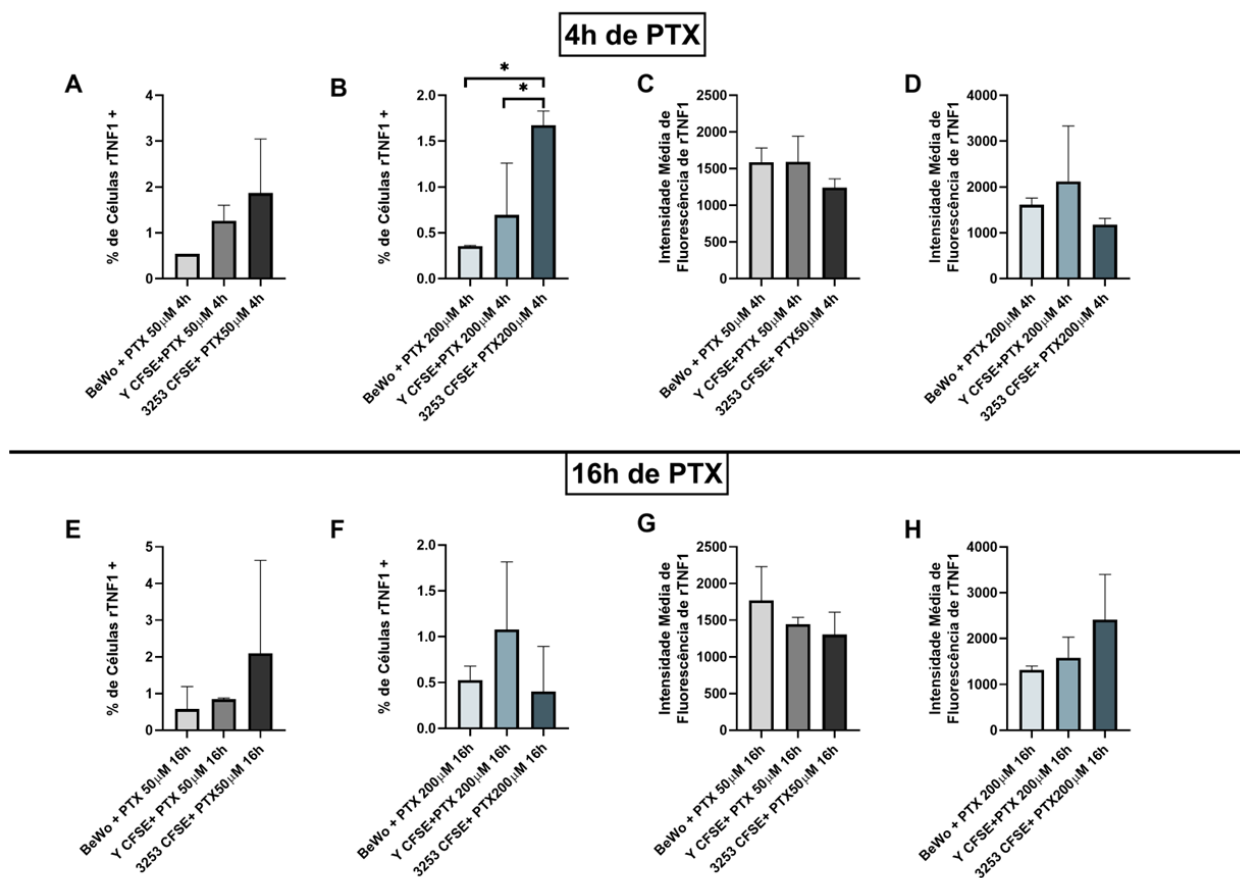
Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de rTNF1 em células CFSE- para a cepa 3253, o tratamento com 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas induziu uma diminuição significativa da porcentagem de células rTNF1+ em relação às células não tratadas (Figura 21F). Esse mesmo tratamento induziu a um aumento na intensidade de expressão desse receptor, que foi maior do que todas as outras condições (Figura 21H).



**Figura 21 – Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE (A) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (B) 3253 rTNF1+, tratadas a por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células CFSE- para a cepa Y ou (D) 3253, tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (F) 3253 rTNF1+, tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células CFSE- para a cepa Y ou (H) 3253, tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os símbolos \* e \*\* indicam  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respectivamente. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.13 Células BeWo infectadas com a cepa 3253 e tratadas com PTX 200 $\mu$ M por 4 horas apresentam maior porcentagem de expressão de rTNF1

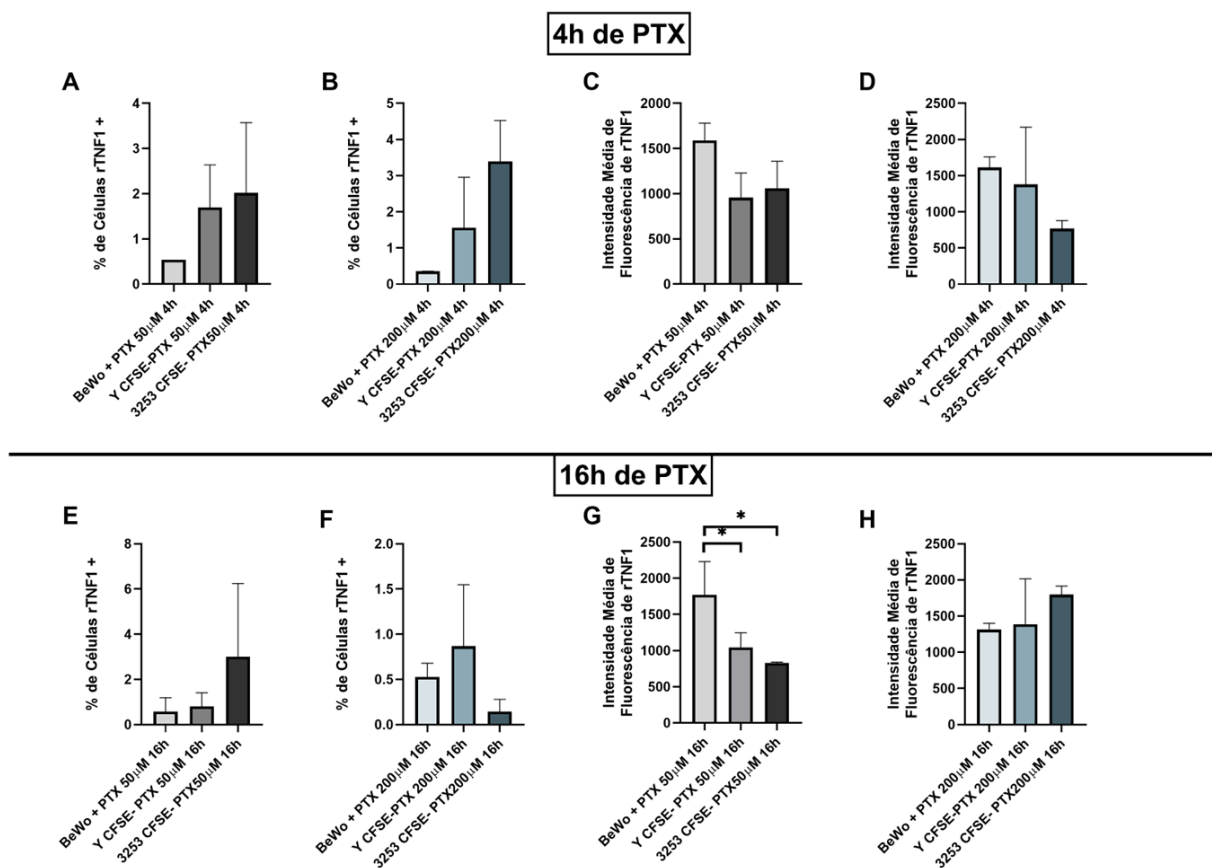
Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de rTNF1 entre células BeWo não expostas aos parasitos e células CFSE+ para as cepas Y ou 3253, tratadas com PTX, a infecção pela cepa 3253 induziu a maior porcentagem de células rTNF1+ quando tratadas com 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas. Essa diferença foi significativa tanto em comparação com células infectadas pela cepa Y quanto em células BeWo somente (Figura 22B).



**Figura 22 – Comparação da expressão de rTNF1 entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas, células infectadas com as cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* submetidas a diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e CFSE+ para a cepa 3253 rTNF1+, tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (B) 200 $\mu$ M de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo e células CFSE+ tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (D) 200 $\mu$ M de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo e células CFSE+ rTNF1+, tratadas com 50 $\mu$ M ou (F) 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas; (G) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo e células CFSE+ tratadas por 16 horas com 50 $\mu$ M ou (H) 200 $\mu$ M de PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* indica  $p < 0.05$ . As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.14 Células BeWo expostas, mas não infectadas com as cepas Y ou 3253 tratadas com 50 $\mu$ M de PTX por 16 horas apresentam menor intensidade de expressão de rTNF1

Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de rTNF1 entre células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253, a exposição às duas cepas induziu menor intensidade de expressão de células rTNF1+ quando tratadas com 50 $\mu$ M de PTX por 16 horas, em relação às células não expostas (Figura 23 G).

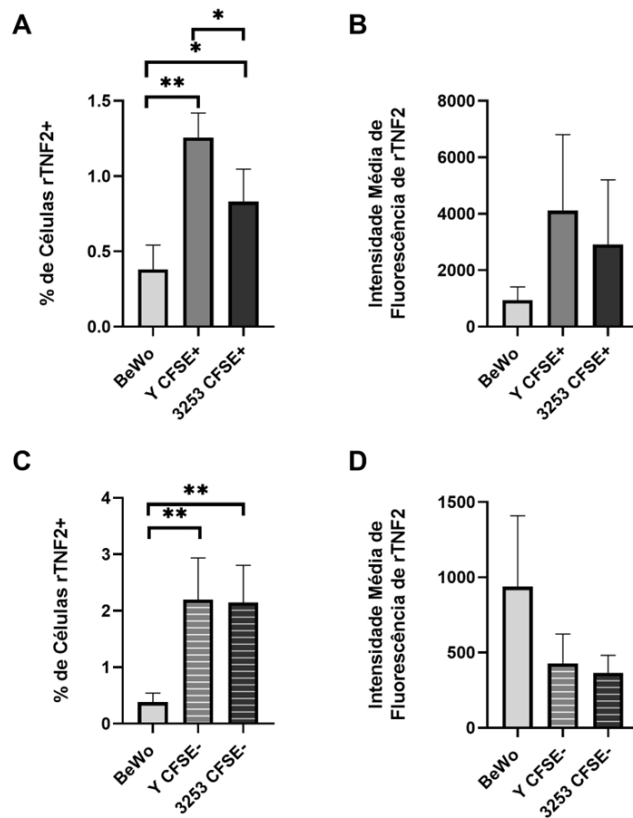


**Figura 23– Avaliação da expressão de rTNF1 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo não expostas, células CFSE- para a cepa Y e CFSE- para a cepa 3253 rTNF1+, tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (B) 200 $\mu$ M de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo e células CFSE- tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M ou (D) 200 $\mu$ M de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo e células CFSE- rTNF1+, tratadas por 16 horas com 50 $\mu$ M ou (F) 200 $\mu$ M de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de rTNF1 em células BeWo e células CFSE- tratadas por 16 horas com 50 $\mu$ M ou (H) 200 $\mu$ M de PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* indica p < 0.05. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



### 5.2.15 A infecção e exposição às cepas Y ou 3253 induz a um aumento na porcentagem de expressão de rTNF2 em células BeWo

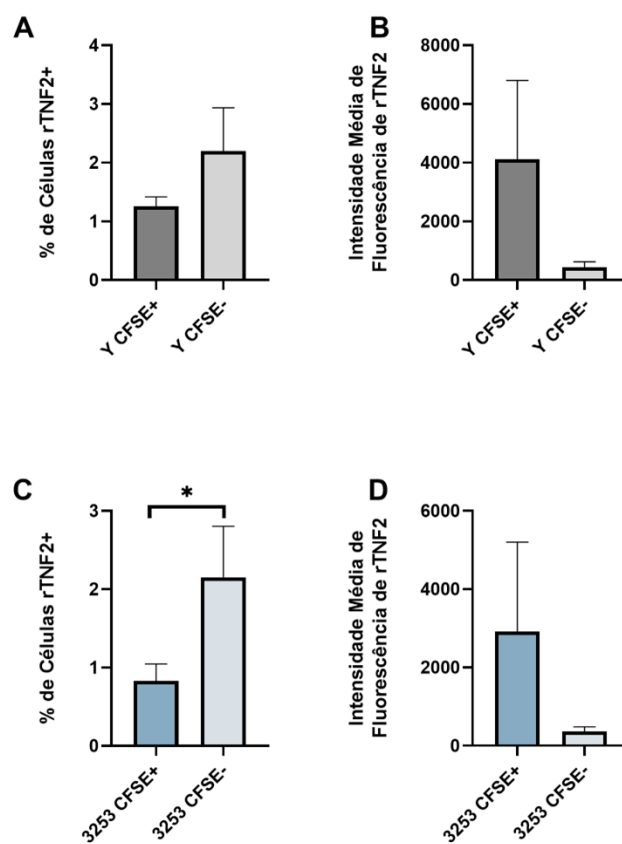
Quando comparadas com células BeWo não expostas aos parasitos, células BeWo CFSE+ para as cepas Y ou 3253 apresentaram maior porcentagem de expressão de rTNF2. (Figura 24). A infecção pela cepa Y induziu maior aumento quando comparada com a cepa 3253 (Figura 24A). Células CFSE- para as duas cepas também apresentaram maior porcentagem de células rTNF2 (Figura 24C). Não houve diferença significativa quando comparadas as intensidades de expressão de rTNF2 (Figuras 24B e D).



**Figura 24– Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253 de *T.cruzi*.** Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e para a cepa 3253 rTNF2+; (B) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células BeWo e células CFSE+ para Y ou 3253; (C) Porcentagem de células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253 rTNF2+; (D) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os símbolos \* e \*\* indicam  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respectivamente. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.16 Células BeWo expostas à cepa 3253, mas não infectadas expressam mais rTNF2 do que células infectadas

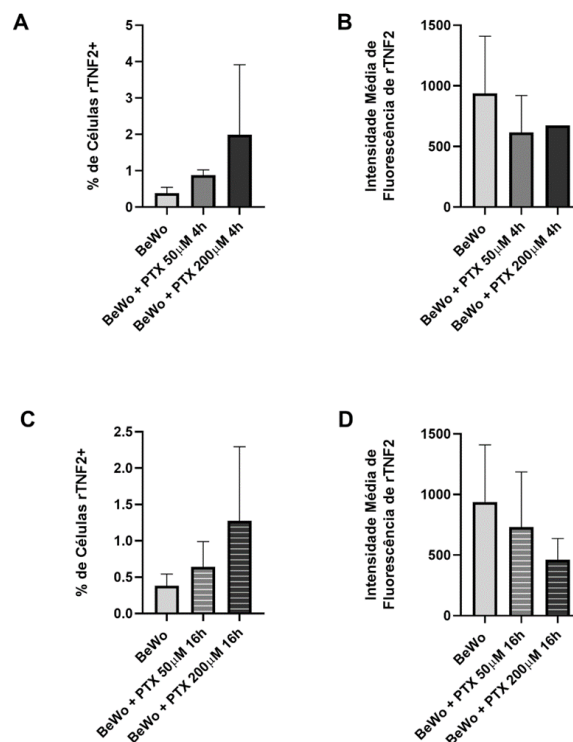
Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de rTNF2 entre células BeWo CFSE+ e CFSE- para cepa Y, não houve diferenças significativas (Figuras 25A e B). Já para a cepa 3253, a porcentagem de células CFSE- expressando o receptor foi maior do que de células CFSE+ (Figura 25C), mas a intensidade de expressão foi estatisticamente semelhante (Figura 25D).



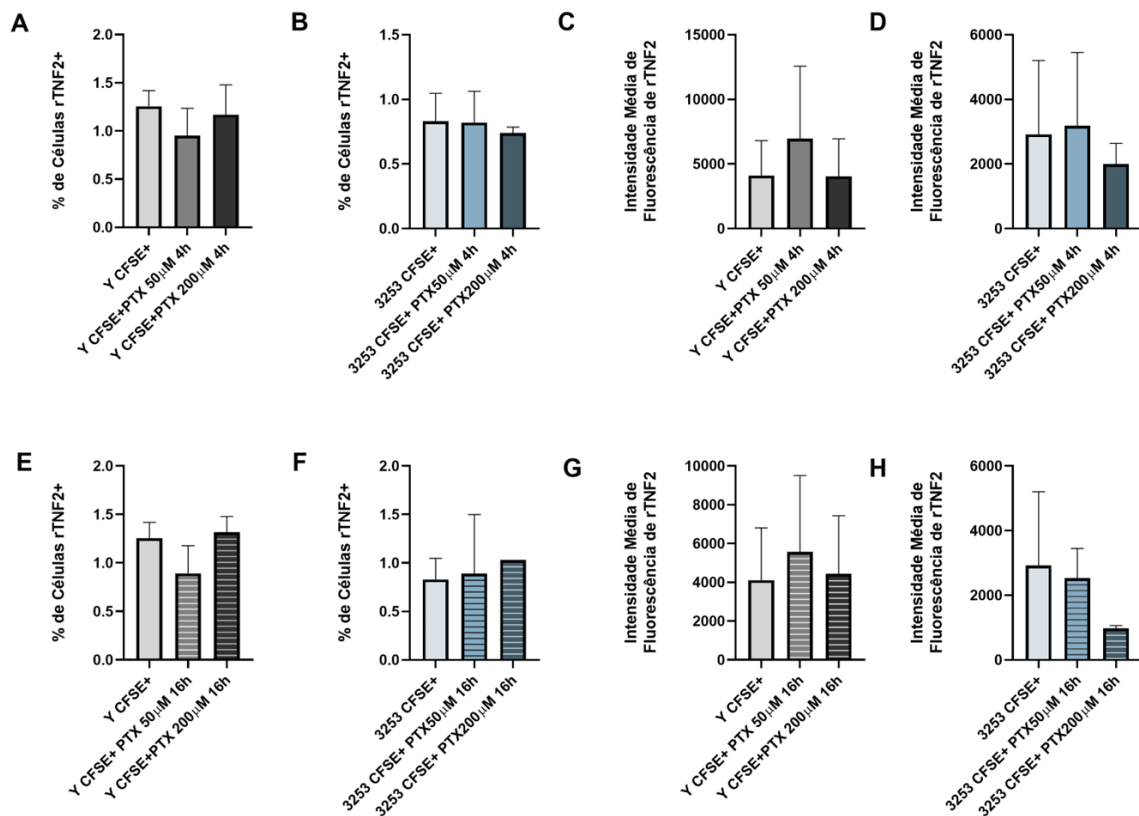
**Figura 25 – Comparação da expressão de rTNF2 entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas as cepas Y ou 3253.** Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo rTNF2+ em células CFSE+ e CFSE- para Y; (B) Intensidade média de rTNF2 em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa Y; (C) Porcentagem de células BeWo rTNF2+ em células CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253; (D) Intensidade média de rTNF2 em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* indica  $p < 0.05$ . As comparações foram realizadas utilizando o teste t. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.17 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou porcentagem de expressão de rTNF2 em células BeWo somente ou em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253

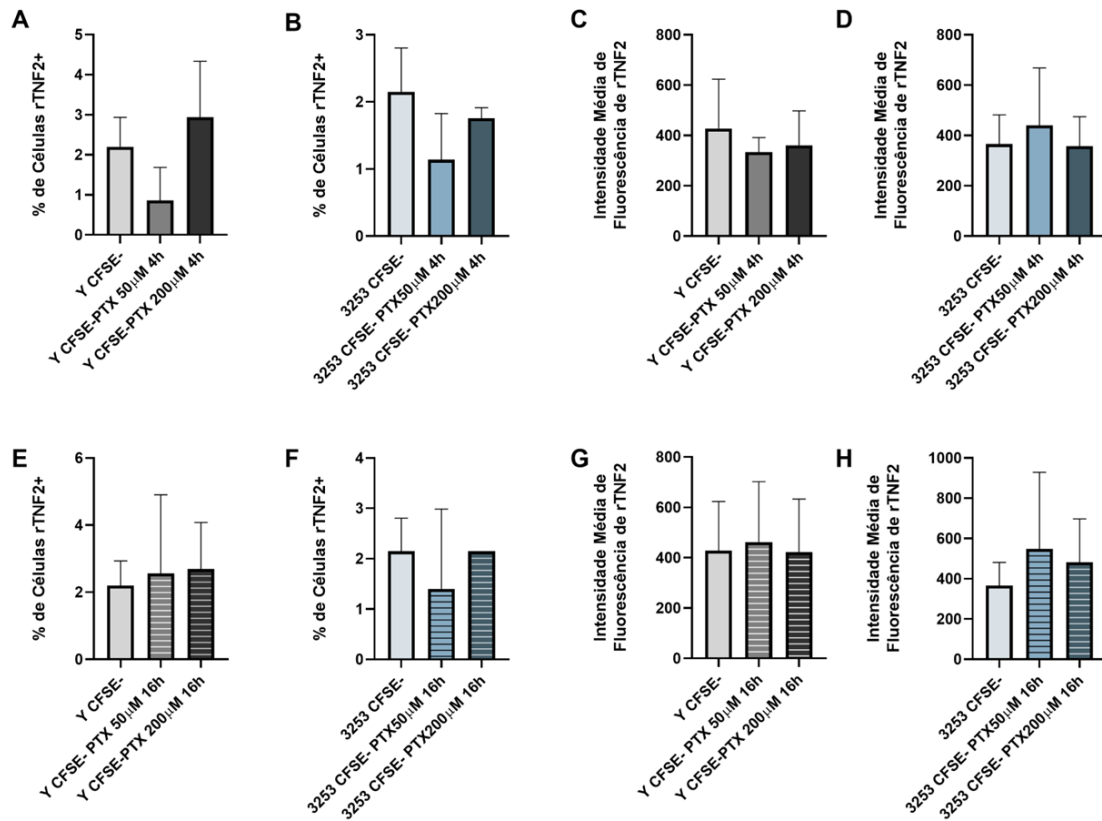
Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de rTNF2 em células BeWo não expostas aos parasitos, não houve diferença entre as populações submetidas aos diferentes tratamentos com PTX. A porcentagem e a intensidade de expressão do receptor foram semelhantes em células não tratadas, células tratadas com PTX 50 $\mu$ M por 4 horas e células tratadas com PTX 200 $\mu$ M por 4 horas (Figuras 26A e B). O mesmo ocorreu para a porcentagem e intensidade em células tratadas por 16 horas com PTX (Figuras 26 C e D). Não houve diferenças significativas na intensidade e porcentagem de expressão de rTNF2 entre os diferentes tratamentos com PTX em células CFSE+ para a cepa Y ou para a cepa 3253 (Figura 27) ou em células CFSE- (Figura 28).



**Figura 26 – Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. (A) Porcentagem de células BeWo rTNF2+ e (B) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células BeWo não tratadas ou tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Porcentagem de células BeWo rTNF2+ ou (D) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células BeWo não tratadas ou tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



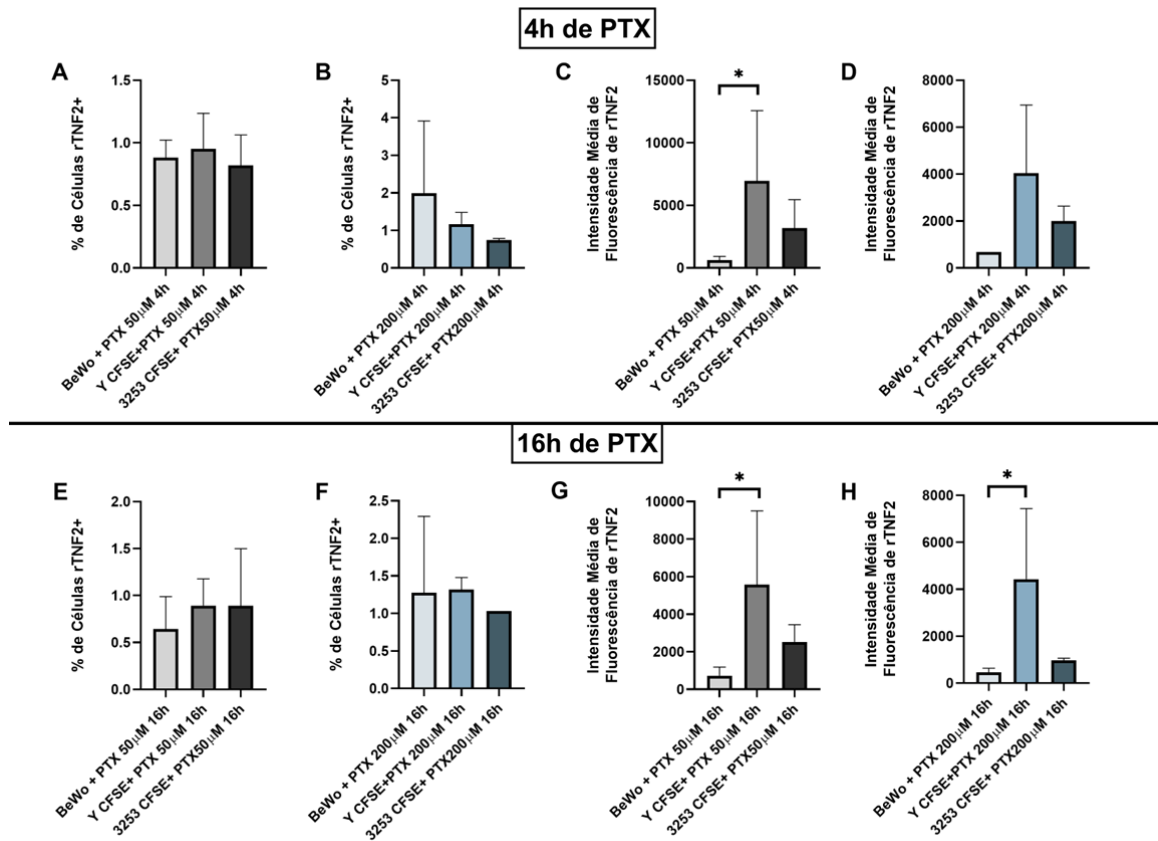
**Figura 27– Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50 $\mu$ M ou 200 $\mu$ M de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE (A) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (B) 3253 rTNF2+, tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células CFSE+ para a cepa Y ou (D) 3253, tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (F) 3253 rTNF2+, tratadas a por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células CFSE+ para a cepa Y ou (H) 3253, tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



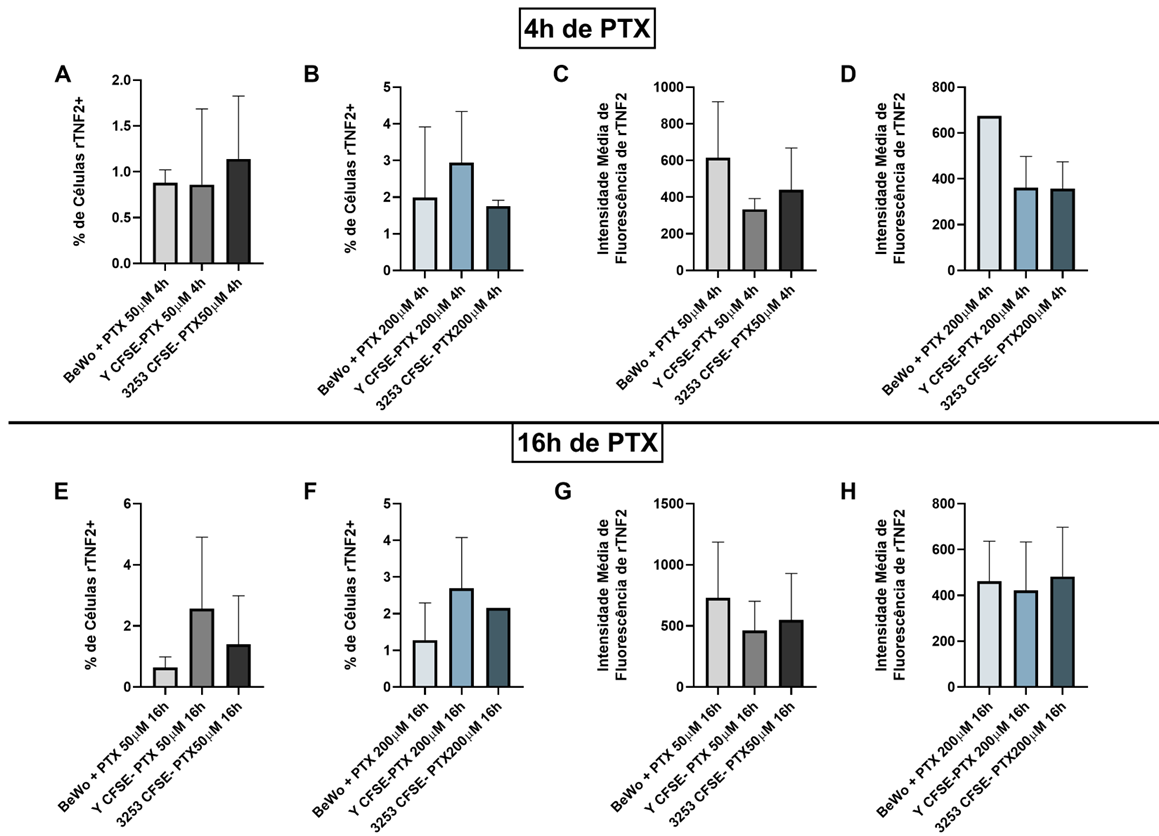
**Figura 28 – Avaliação da expressão de rTNF2 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50 μM ou 200 μM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE (A) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (B) 3253 rTNF2+, tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células CFSE- para a cepa Y ou (D) 3253, tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (F) 3253 rTNF2+, tratadas a por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de rTNF2 em células CFSE- para a cepa Y ou (H) 3253, tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### **5.2.18 A exposição à cepa Y induz um aumento da expressão de rTNF2 em células BeWo tratadas com PTX**

A porcentagem de expressão de rTNF2 foi semelhante em células BeWo não expostas aos parasitos e em células CFSE+ para as duas cepas, quando houve tratamento por 4 ou 16 horas com diferentes concentrações de PTX (Figura 29 A, B, E e F). A intensidade de expressão de rTNF2 em células CFSE+ para a cepa Y foi maior do que em células BeWo, quando tratadas com 50 $\mu$ M de PTX por 4 (Figura 29C) e 16 horas (Figura 29G) e tratadas com PTX 200 $\mu$ M por 16 horas (Figura 29H). Não houve diferenças significativas quando comparadas com células CFSE+ para a cepa 3253, nem entre células BeWo e células CFSE+ para a cepa 3253. Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de rTNF2 entre células BeWo e células CFSE- para as cepas Y e 3253, não houve diferenças significativas (Figura 30).



**Figura 29 – Comparação da expressão de rTNF2 entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas, células infectadas com as cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* tratadas com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e CFSE+ para a cepa 3253 rTNF2+, tratadas por 4 horas com 50µM ou (B) 200µM de PTX; (C) Intensidade média de rTNF2 em células BeWo e células CFSE+ tratadas por 4 horas com 50µM ou (D) 200µM de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo e células CFSE+ rTNF2+, tratadas com 50µM ou (F) 200µM de PTX por 16 horas; (G) Intensidade média de rTNF2 em células BeWo e células CFSE+ tratadas por 16 horas com 50µM ou (H) 200µM de PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. O símbolo \* indica  $p < 0.05$ . As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

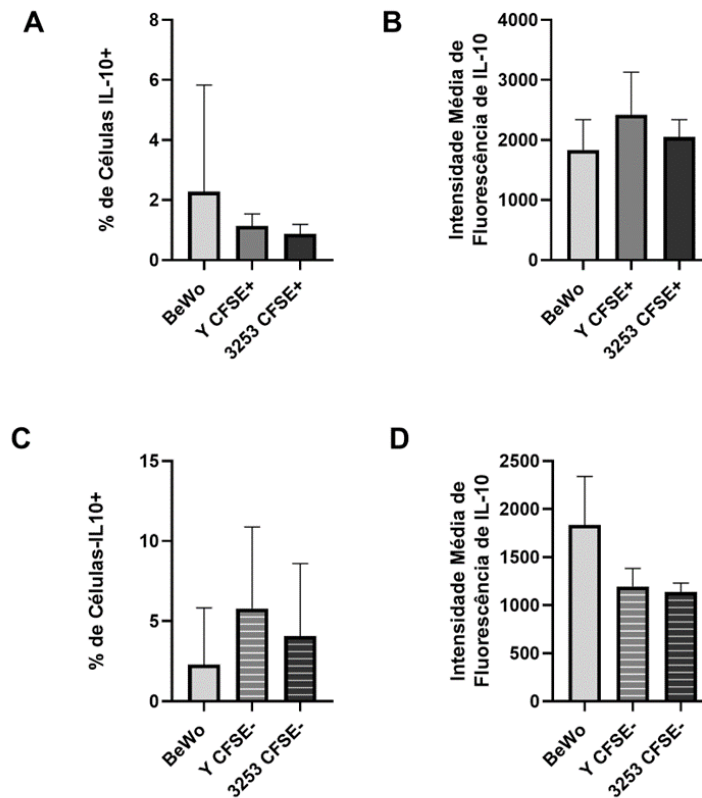


**Figura 30– Comparação da expressão de rTNF2 entre células BeWo não expostas aos tripomastigotas e células expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* tratadas com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE- para a cepa Y e CFSE- para a cepa 3253 rTNF2+, tratadas por 4 horas com 50µM ou (B) 200µM de PTX; (C) Intensidade média de rTNF2 em células BeWo e células CFSE- tratadas por 4 horas com 50µM ou (D) 200µM de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo e células CFSE- rTNF2+, tratadas com 50µM ou (F) 200µM de PTX por 16 horas; (G) Intensidade média de rTNF2 em células BeWo e células CFSE- tratadas por 16 horas com 50µM ou (H) 200µM de PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. O símbolo \* indica  $p < 0.05$ . As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



### 5.2.19 A infecção ou exposição às cepas Y ou 3253 não induz aumento da expressão de IL-10 em células BeWo

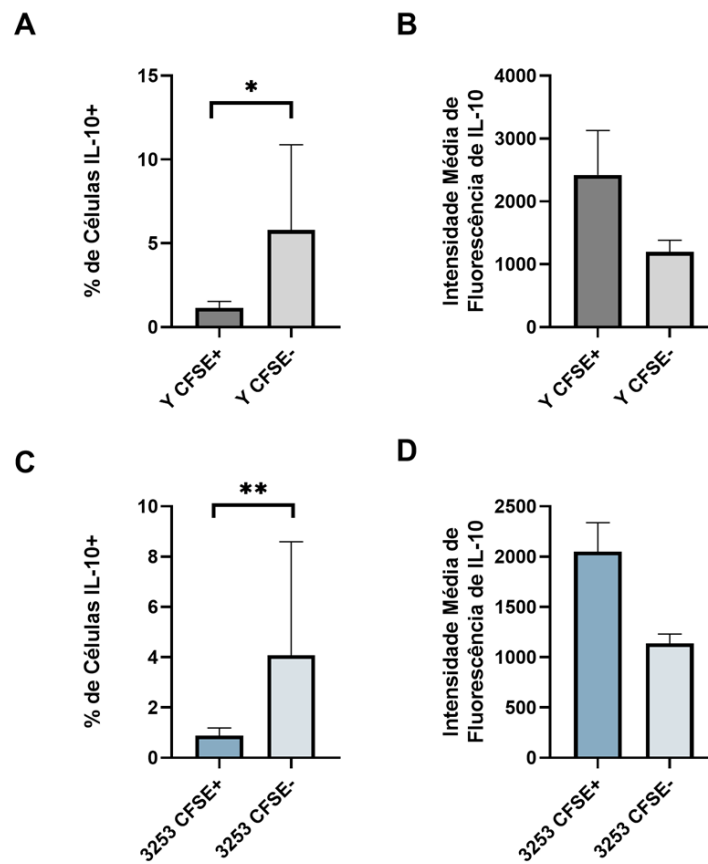
Avaliamos a influência da infecção ou tratamento com PTX na expressão de uma citocina modulatória, a IL-10. Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de IL-10, não houve diferença significativa entre células BeWo CFSE+ (Figuras 31 A e B) ou CFSE- (Figuras 31 C e D) para as cepas Y ou 3253 de *T. cruzi* e células BeWo somente.



**Figura 31 – Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo infectadas ou expostas às cepas Y ou 3253 de *T. cruzi*.** Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e células CFSE+ para a cepa 3253 IL-10+; (B) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células BeWo e células CFSE+ para as cepas Y ou 3253; (C) Porcentagem de células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253 IL-10+; (D) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.20 Células expostas aos parasitos, mas não infectadas exibem maior porcentagem de expressão de IL-10 que células infectadas com as cepas Y ou 3253

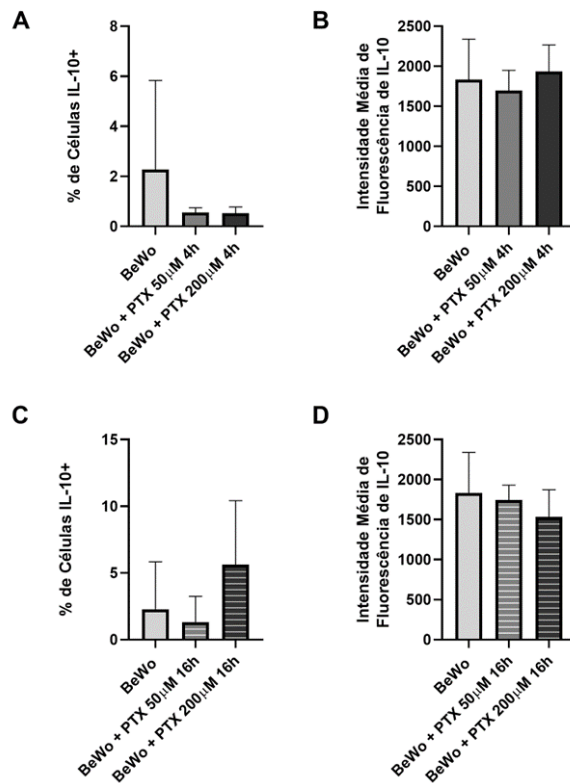
Comparando-se a expressão de IL-10 entre células BeWo CFSE+ e CFSE- para as cepas Y ou 3253, observou-se maior porcentagem de expressão em células CFSE- (Figura 32 A e C). A intensidade de expressão, no entanto, não foi estatisticamente diferente (Figura 32 B e D).



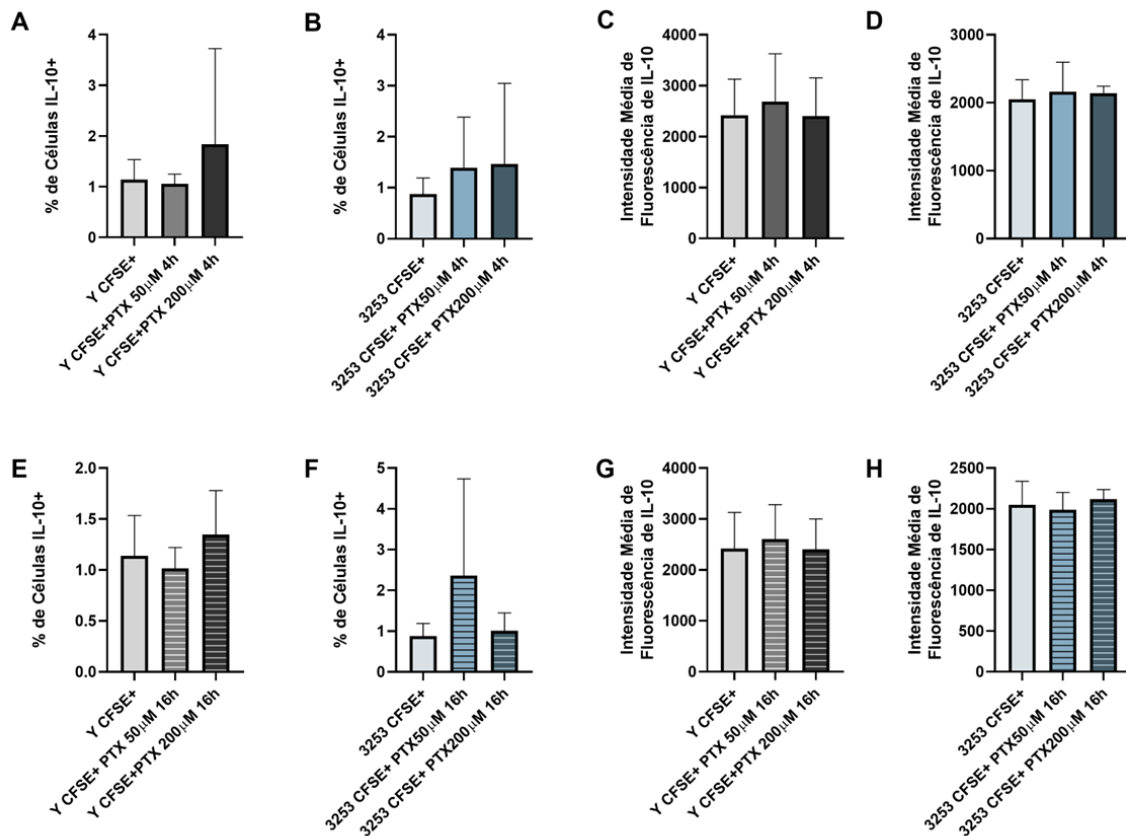
**Figura 32–** Comparação da expressão de IL-10 entre células BeWo infectadas e células BeWo expostas, mas não infectadas às cepas Y ou 3253. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo IL-10+ em células CFSE+ e CFSE- para a cepa Y; (B) Intensidade média de IL-10 em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa Y; (C) Porcentagem de células BeWo IL-10+ em células CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253; (D) Intensidade média de IL-10 em células BeWo CFSE+ e CFSE- para a cepa 3253. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os símbolos \* e \*\* indicam  $p < 0.05$  e  $p < 0.01$ , respectivamente. As comparações foram realizadas utilizando o teste t não pareado. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### 5.2.21 Os diferentes tratamentos com PTX não alteram a intensidade ou porcentagem de expressão de IL-10 em células BeWo somente ou em células BeWo expostas às cepas Y ou 3253

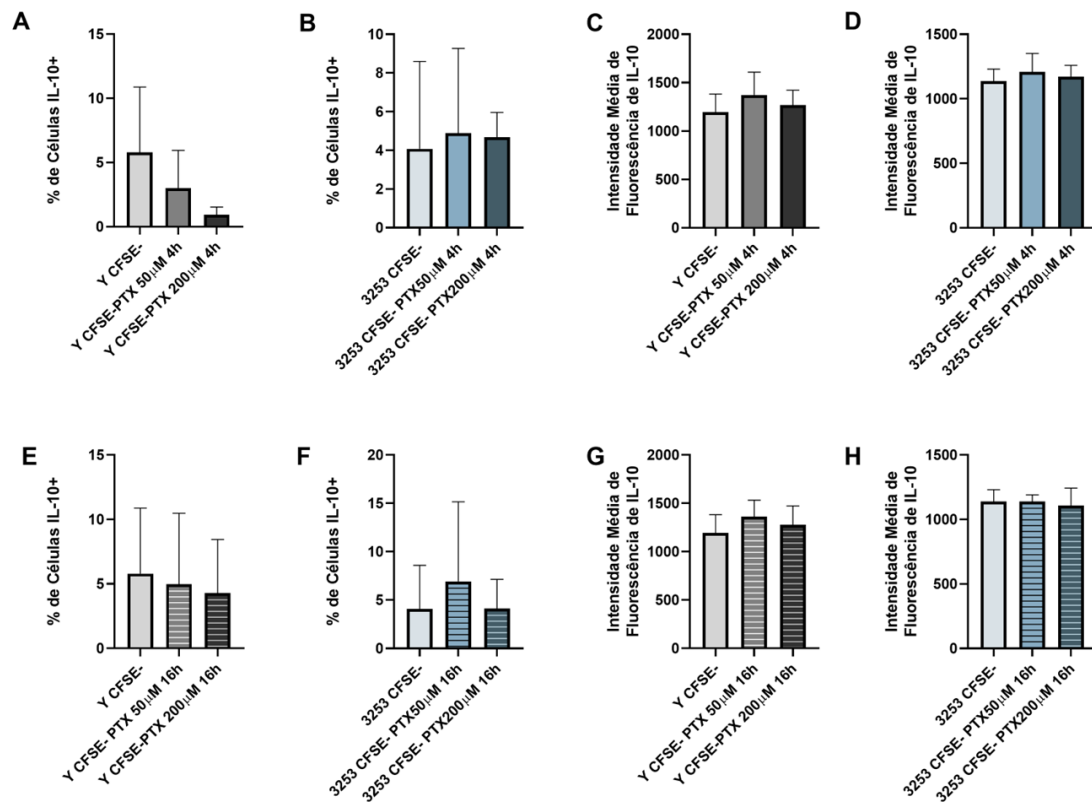
Os tratamentos com PTX em diferentes concentrações por 4 ou 16 horas não alteraram a porcentagem ou intensidade de expressão de IL-10 em células BeWo em comparação com células não tratadas (Figura 33). Também não houve diferenças significativas na porcentagem ou na intensidade de expressão de IL-10 entre os diferentes tratamentos com PTX em células BeWo CFSE+ (Figura 34) ou CFSE- (Figura 35) para as cepas Y ou 3253, em comparação com células não tratadas.



**Figura 33– Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. (A) Porcentagem de células BeWo IL-10+ tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (B) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células BeWo tratadas por 4 horas com PTX; (C) Porcentagem de células BeWo IL-10+ tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (D) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células BeWo tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



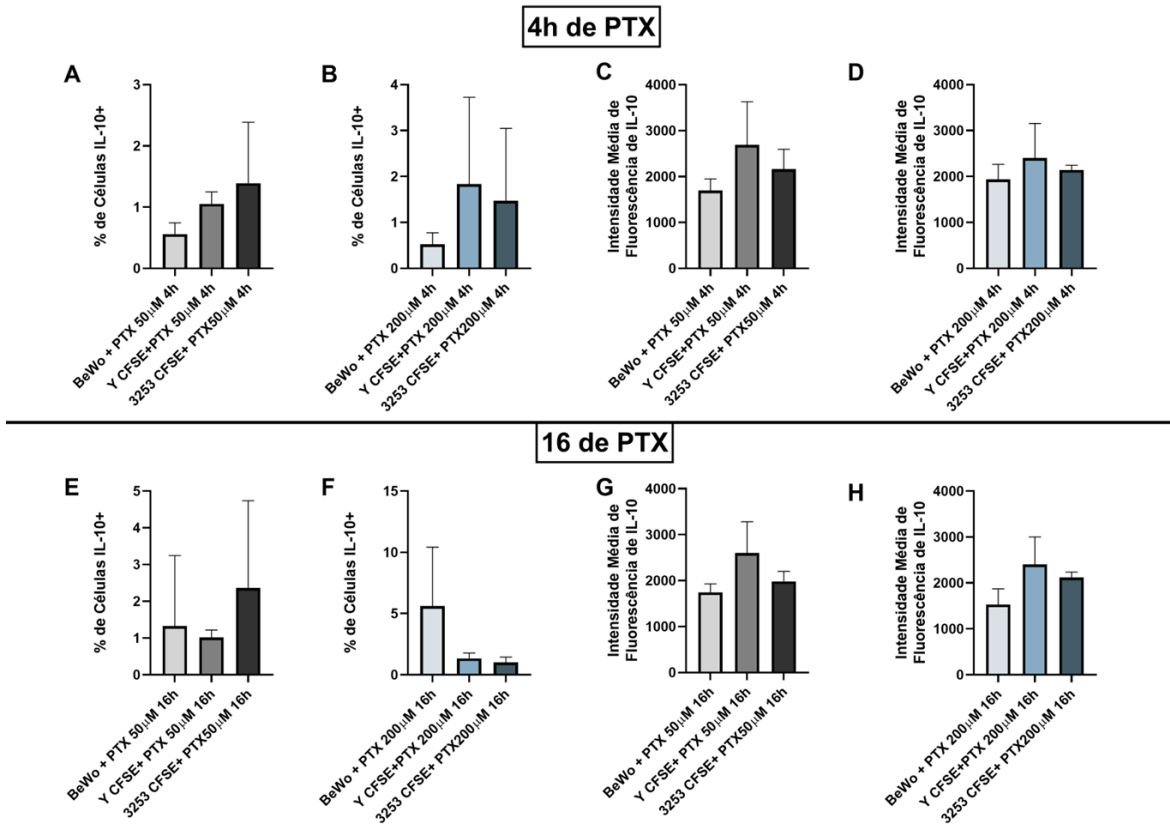
**Figura 34 – Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX) e infectadas com as cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE (A) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (B) 3253 IL-10+, tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células CFSE+ para a cepa Y ou (D) 3253, tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE+ para a cepa Y ou (F) 3253 IL-10+, tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células CFSE+ para a cepa Y ou (H) 3253, tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



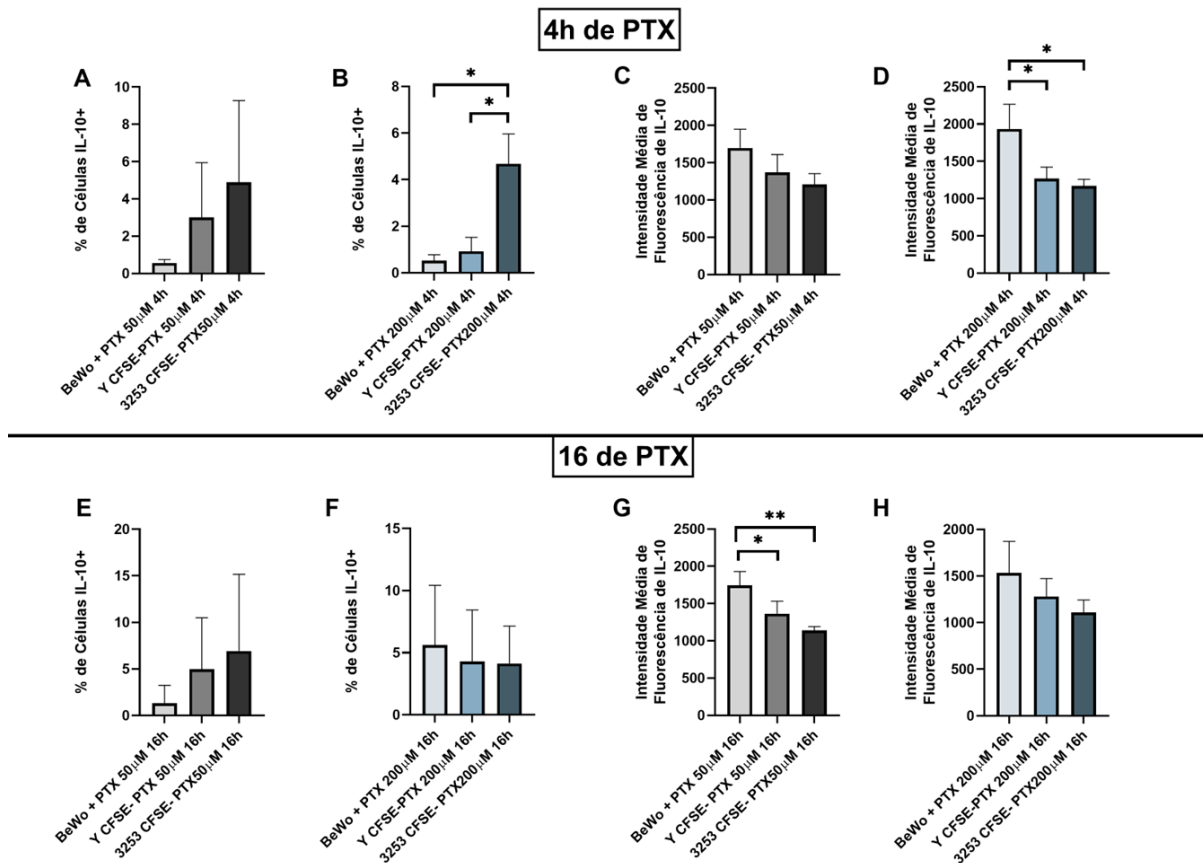
**Figura 35 – Avaliação da expressão de IL-10 em células BeWo submetidas aos diferentes tratamentos com PTX (PTX) e expostas, mas não infectadas, às cepas Y ou 3253.** As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE (A) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (B) 3253 IL-10+, tratadas por 4 horas com diferentes concentrações de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células CFSE- para a cepa Y ou (D) 3253, tratadas por 4 horas com PTX; (E) Porcentagem de células CFSE- para a cepa Y ou (F) 3253 IL-10+, tratadas por 16 horas com diferentes concentrações de PTX; (G) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células CFSE- para a cepa Y ou (H) 3253, tratadas por 16 horas com PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

### **5.2.22 A exposição aos parasitos induziu uma diminuição na intensidade e aumento na porcentagem de expressão de IL-10 em células BeWo submetidas ao tratamento com PTX**

Quando comparadas a porcentagem e intensidade de expressão de IL-10 entre células CFSE+ para as cepas Y ou 3253 e células BeWo não expostas, tratadas com diferentes concentrações de PTX, não houve diferenças significativas (Figura 36). A porcentagem de células BeWo CFSE- para as cepas Y ou 3253 expressando a citocina também não foi estatisticamente diferente da de células BeWo somente, tratadas com 50 $\mu$ M de PTX por 4 ou 16 horas (Figura 37 A e E). Já em células tratadas com 200 $\mu$ M de PTX por 4h, a porcentagem de expressão de IL-10 foi maior em células CFSE- para a cepa 3253 do que em células BeWo e células CFSE- para a cepa Y (Figura 37 B), o que não foi observado com 16 horas de tratamento (Figura 37 F). A intensidade de expressão de IL-10 em células tratadas por 4 horas com 50 $\mu$ M de PTX (Figura 37C) ou por 16h com 200 $\mu$ M (Figura 37H) não foi estatisticamente diferente entre grupos. Porém, em células tratadas por 4h com 200 $\mu$ M (Figura 37D) e por 16h com 50 $\mu$ M da droga (Figura 37 G), houve uma menor intensidade de expressão da citocina em células CFSE- em comparação com células BeWo não expostas aos parasitos.



**Figura 36– Comparação da expressão de IL-10 entre células BeWo não expostas aos parasitos e células BeWo infectadas com as cepas Y e 3253 de *T. cruzi* tratadas com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e CFSE+ para a 3253 IL-10+, tratadas por 4 horas com 50µM ou (B) 200µM de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células BeWo e células CFSE+ para as cepas Y ou 3253 tratadas por 4 horas com 50µM ou (D) 200µM de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo, células CFSE+ para a cepa Y e CFSE+ para a 3253 IL-10+, tratadas por 16 horas com 50µM ou (F) 200µM de PTX; (G) Intensidade média de IL-10 em células BeWo e células CFSE+ tratadas por 16 horas com 50µM ou (H) 200µM de PTX. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



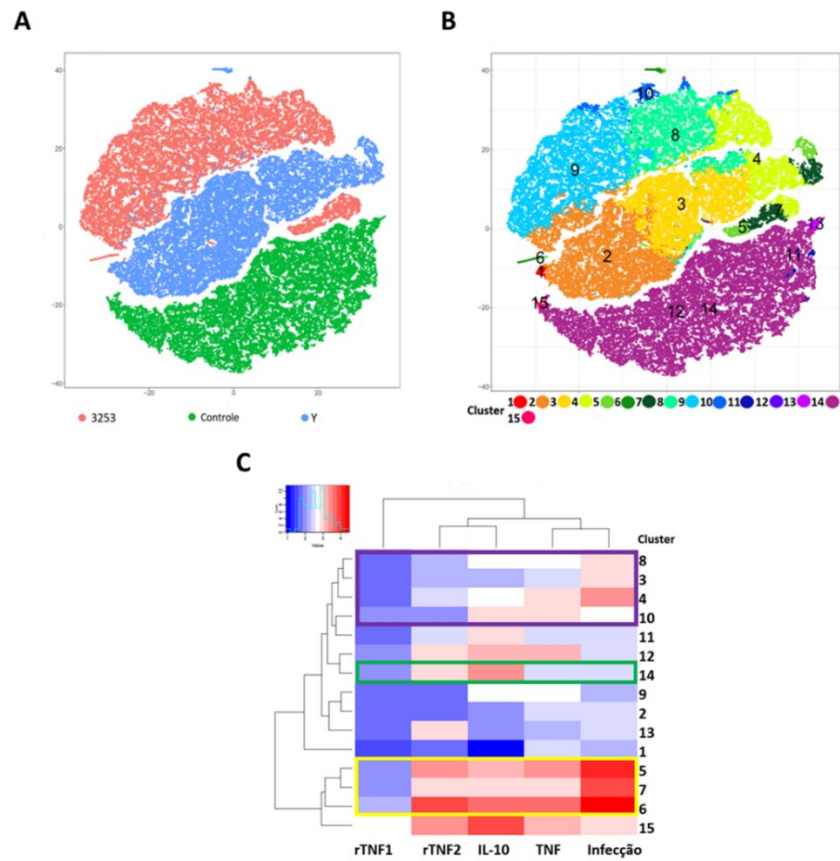
**Figura 37– Comparação da expressão de IL-10 entre células BeWo não expostas e células expostas, mas não infectadas às cepas 3253 ou Y de *T. cruzi* nos diferentes tratamentos com pentoxifilina (PTX).** As células foram tratadas com 50µM ou 200µM de PTX, por 4 ou 16 horas. Os tripomastigotas foram previamente corados com CFSE. (A) Porcentagem de células BeWo, células CFSE- para a cepa Y e CFSE+ para a 3253 IL-10+, tratadas por 4 horas com 50µM ou (B) 200µM de PTX; (C) Intensidade média de fluorescência de IL-10 em células BeWo e células CFSE- para as cepas Y ou 3253 tratadas por 4 horas com 50µM ou (D) 200µM de PTX; (E) Porcentagem de células BeWo, células CFSE- para a cepa Y e CFSE+ para a 3253 IL-10+, tratadas por 16 horas com 50µM ou (F) 200µM de PTX; (G) Intensidade média de IL-10 em células BeWo e células CFSE- tratadas por 16 horas com 50µM ou (H) 200µM de PTX. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As comparações foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.



### **5.3 Análises de t-SNE da infecção, expressão de citocinas e receptores por células BeWo infectadas com as cepas Y ou 3253 de *T. cruzi***

#### **5.3.1 A infecção pelas cepas Y ou 3253 altera a expressão de citocinas e receptores de TNF**

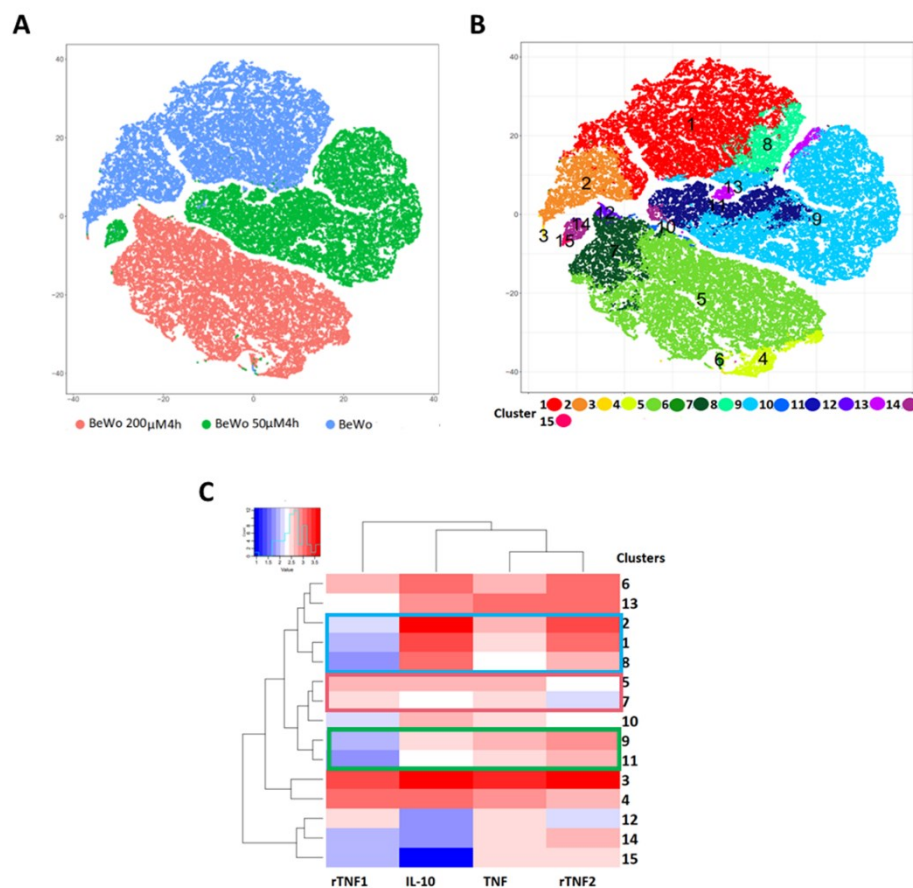
As análises de *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE) foram realizadas nas populações de BeWo, BeWo expostas à cepa Y e expostas à cepa 3253 (Figura 38). Os *clusters* 5, 6 e 7 (retângulo amarelo) apresentaram alta intensidade de infecção e expressão de rTNF2, IL-10 e TNF e foram observados nas populações infectadas tanto por parasitos da cepa Y como da 3253. Os *clusters* 8, 3, 4 e 10 (retângulo roxo) apresentaram intensidade menor de infecção e baixa expressão de TNF, IL-10 e rTNF2 e também estão presentes nas populações infectadas pelas duas cepas. O *cluster* 14 (retângulo verde) representa a maioria da população de células BeWo e apresentou maior expressão de IL-10 e rTNF2 e menor de TNF do que os *clusters* com baixa intensidade de infecção. A expressão de rTNF1 foi baixa em todos os *clusters*.



**Figura 38-t-SNE de células BeWo, células BeWo expostas à cepa y e células BeWo expostas à cepa 3253.** (A) Representação de t-SNE das populações de BeWo (verde), infectadas com 3253 (rosa) e Y (azul). (B) *Clusters* de populações identificadas pelo FlowSom. (C) *Heatmap* da expressão das citocinas, receptores e da infecção pelo parasito por cada *cluster*.

### 5.3.2 O tratamento com 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas induz aumento de intensidade de expressão de rTNF1 em células BeWo

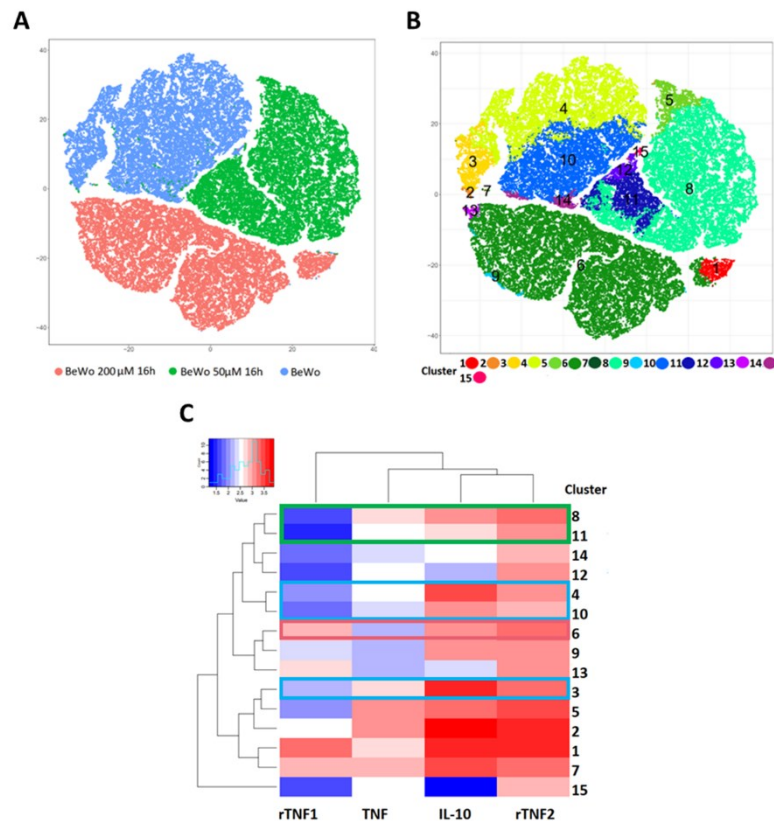
t-SNE foi realizado nas populações de BeWo não tratadas e tratadas com PTX 50 e 200 $\mu$ M por 4 horas (Figura 39). Os *clusters* 1, 2 e 8 (retângulo azul) ocorreram predominantemente nas populações não tratadas com PTX e apresentaram baixa expressão de rTNF1 e alta de rTNF2, IL-10 e TNF. Os *clusters* 5 e 7 (retângulo rosa), que ocorreram predominantemente em populações tratadas com 200 $\mu$ M de PTX, apresentaram menor intensidade de expressão de rTNF2 e maior de rTNF1 do que os *clusters* de populações não tratadas e os *clusters* 9 e 11, que ocorreram predominantemente em populações tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (retângulo verde).



**Figura 39-t-SNE de células BeWo tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de pentoxifilina (PTX) por 4 horas.** (A) Representação de t-SNE das populações de BeWo não tratadas (azul), tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (verde) e 200 $\mu$ M de PTX (rosa). (B) *Clusters* de populações identificadas pelo FlowSom. (C) *Heatmap* da expressão das citocinas e receptores por cada *cluster*.

### 5.3.3 O tratamento com 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas induz aumento de intensidade de expressão de rTNF1 e diminuição de TNF em células BeWo

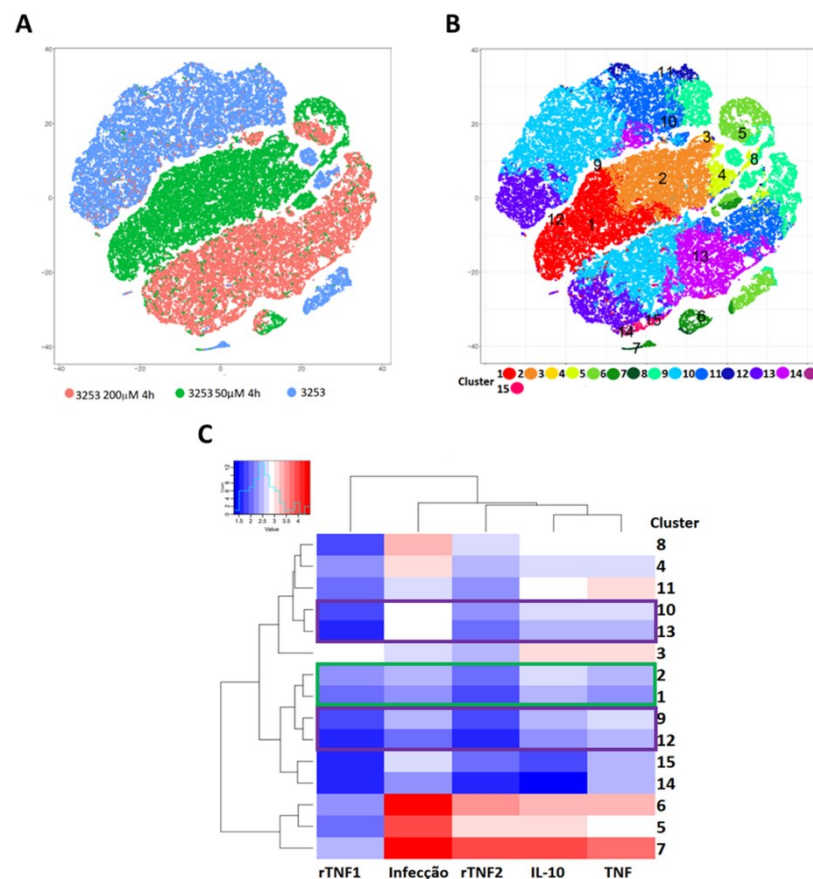
t-SNE foi realizado nas populações de BeWo não tratadas e tratadas com 50 e 200  $\mu$ M de PTX por 16 horas (Figura 40). O *cluster* 6 (retângulo rosa) ocorreu predominantemente em populações tratadas com 200 $\mu$ M de PTX e apresentou maior expressão de rTNF1 e menor de TNF do que os *clusters* 8 e 11 (retângulo verde), compostos por populações tratadas com 50 $\mu$ M de PTX e do que os *clusters* 3, 4 e 10, que representaram populações não tratadas (retângulo azul).



**Figura 40-** t-SNE de células BeWo tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas. (A) Representação de t-SNE das populações de BeWo não tratadas (azul), tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (verde) e 200 $\mu$ M de PTX (rosa). (B) Clusters de populações identificadas pelo FlowSom. (C) *Heatmap* da expressão das citocinas e receptores por cada cluster

### 5.3.4 O tratamento com diferentes concentrações de PTX por 4 horas não altera a expressão de citocinas e receptores por células BeWo expostas à cepa 3253

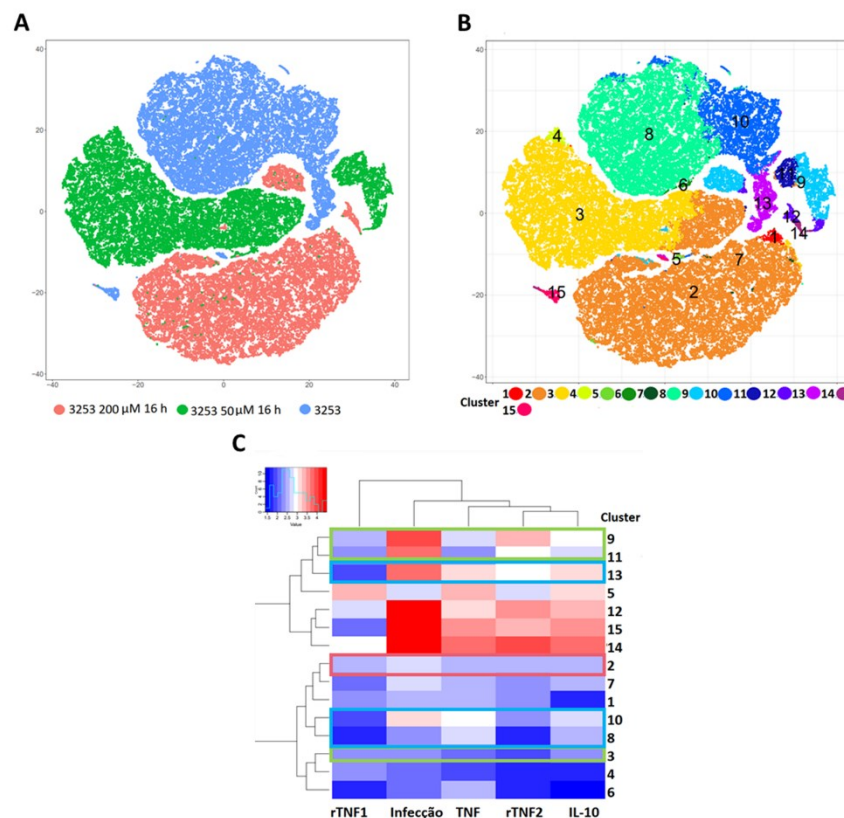
t-SNE foi realizado nas populações de BeWo expostas à cepa 3253 não tratadas e tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas (Figura 41). Os *clusters* 5, 6 e 7 apresentaram alta intensidade de infecção e expressão de IL-10, rTNF2 e TNF e foram compostos por pequenas populações de células, que ocorreram nas três condições. Os *clusters* 1 e 2 (retângulo verde) ocorreram predominantemente em populações tratadas com 50 $\mu$ M de PTX e apresentaram baixa expressão de infecção e expressão de citocinas e receptores, assim como os *clusters* 9, 10, 12 e 13 (retângulo roxo), que ocorreram em populações não tratadas e tratadas com 200 $\mu$ M de PTX.



**Figura 41-** t-SNE de células BeWo expostas à cepa 3253 e tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas. (A) Representação de t-SNE das populações de BeWo expostas ao parasito e não tratadas (azul), tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (verde) e 200 $\mu$ M de PTX (rosa). (B) *Clusters* de populações identificadas pelo FlowSom. (C) *Heatmap* da expressão das citocinas e receptores por cada *cluster*.

### 5.3.5 O tratamento com 50 e 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas diminui a expressão de TNF em células BeWo expostas à cepa 3253

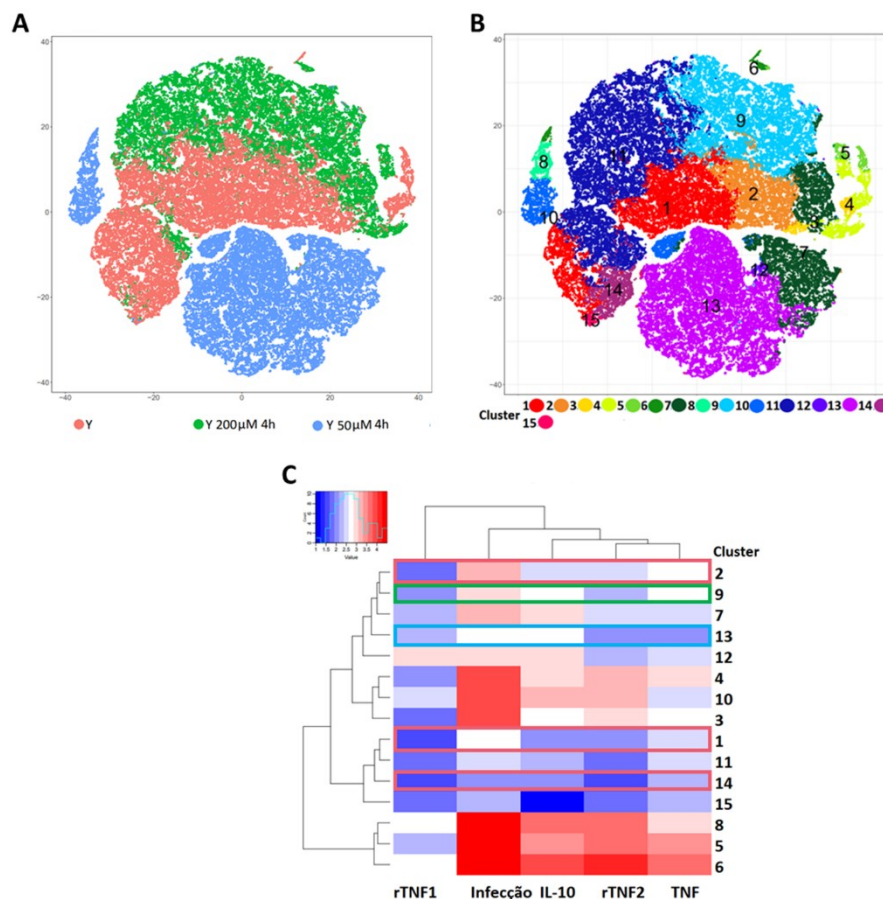
t-SNE foi realizado nas populações de BeWo expostas à cepa 3253 não tratadas e tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas (Figura 42). *Clusters* pertencentes predominantemente a populações tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (*cluster* 3, 9 e 11) e 200 $\mu$ M de PTX (*cluster* 2) (retângulos verde e rosa, respectivamente) apresentaram menor intensidade de expressão de TNF do que *clusters* de populações não tratadas (*clusters* 8, 10 e 13; retângulo azul). Populações tratadas com 200 $\mu$ M de PTX também apresentaram menor intensidade de infecção e expressão de rTNF2 e IL-10 do que as outras duas populações.



**Figura 42-** t-SNE de células BeWo expostas à cepa 3253 e tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas. (A) Representação de t-SNE das populações de BeWo expostas ao parasito e não tratadas (azul), tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (verde) e 200 $\mu$ M de PTX (rosa). (B) *Clusters* de populações identificadas pelo FlowSom. (C) *Heatmap* da expressão das citocinas e receptores por cada *cluster*.

### 5.3.6 O tratamento com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas aumenta a intensidade de expressão de IL-10 em células BeWo expostas à cepa Y

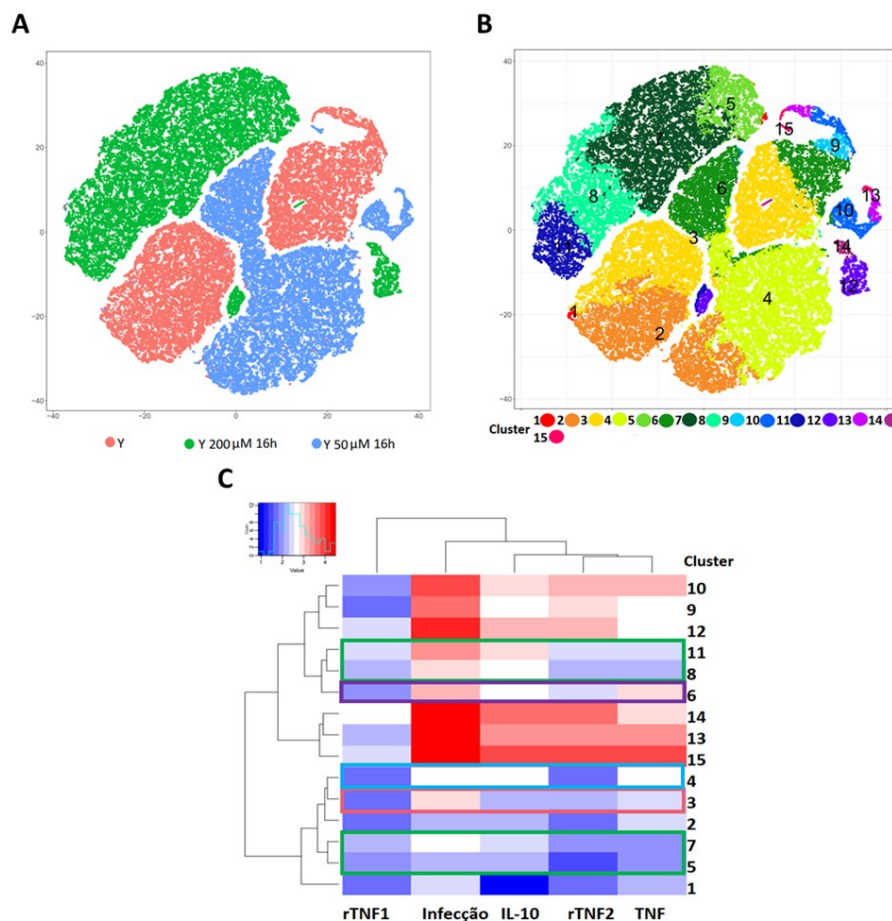
t-SNE foi realizado nas populações de BeWo expostas à cepa Y não tratadas e tratadas com PTX 50 ou 200 $\mu$ M por 4 horas (Figura 43). O *cluster* 13 (retângulo azul), composto principalmente por populações tratadas com 50 $\mu$ M de PTX, apresentou maior intensidade de expressão de IL-10 do que os *clusters* 1, 2 e 14 (retângulo rosa), que foram compostos por populações não tratadas. O mesmo ocorreu para a expressão de IL-10 do *cluster* 9 (retângulo verde), de populações tratadas com 200 $\mu$ M de PTX em comparação com as populações de células não tratadas. *Clusters* de pequenas populações de células altamente infectadas foram observados nas três condições, apresentando alta expressão de TNF, rTNF2 e IL-10 (*clusters* 5, 6 e 8).



**Figura 43-** t-SNE de células BeWo expostas à cepa Y e tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas. (A) Representação de t-SNE das populações de BeWo expostas ao parasito e não tratadas (rosa), tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (azul) e 200 $\mu$ M de PTX (verde). (B) *Clusters* de populações identificadas pelo FlowSom. (C) Heatmap da expressão das citocinas e receptores por cada *cluster*.

### 5.3.7 O tratamento com 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas diminui a expressão de TNF em células BeWo expostas à cepa Y

t-SNE foi realizado nas populações expostas à cepa Y e não tratadas ou tratadas por 16 horas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX (Figura 44). O *cluster* 3 (retângulo rosa), pertencente à população não tratada, apresentou intensidade de infecção e expressão de citocinas semelhantes às do *cluster* 4 (retângulo azul), pertencente às células tratadas com 50 $\mu$ M de PTX. O *cluster* 6 (retângulo roxo), presente nesses dois grupos, apresentou intensidade de infecção semelhante e maior expressão de TNF do que os *clusters* 5, 7 e 8 (retângulo verde), pertencentes às populações tratadas com 200 $\mu$ M de PTX.



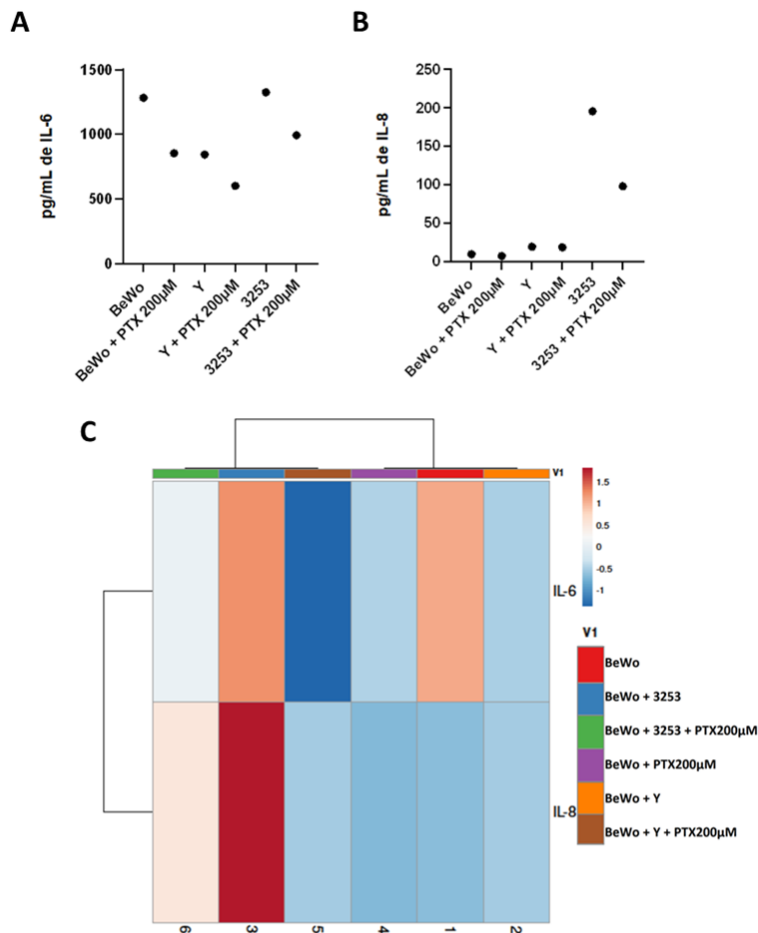
**Figura 44-** t-SNE de células BeWo expostas à cepa Y e tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas. Representação de t-SNE das populações de BeWo expostas ao parasito e não tratadas (rosa), tratadas com 50 $\mu$ M de PTX (azul) e 200 $\mu$ M de PTX (verde). (B) *Clusters* de populações identificadas pelo FlowSom. (C) *Heatmap* da expressão das citocinas e receptores por cada *cluster*.



## 5.4 Análise da expressão de citocinas no sobrenadante das culturas de BeWo e SynBeWo

### 5.4.1 A infecção pela cepa 3253 induz alta expressão de IL-6 e IL-8

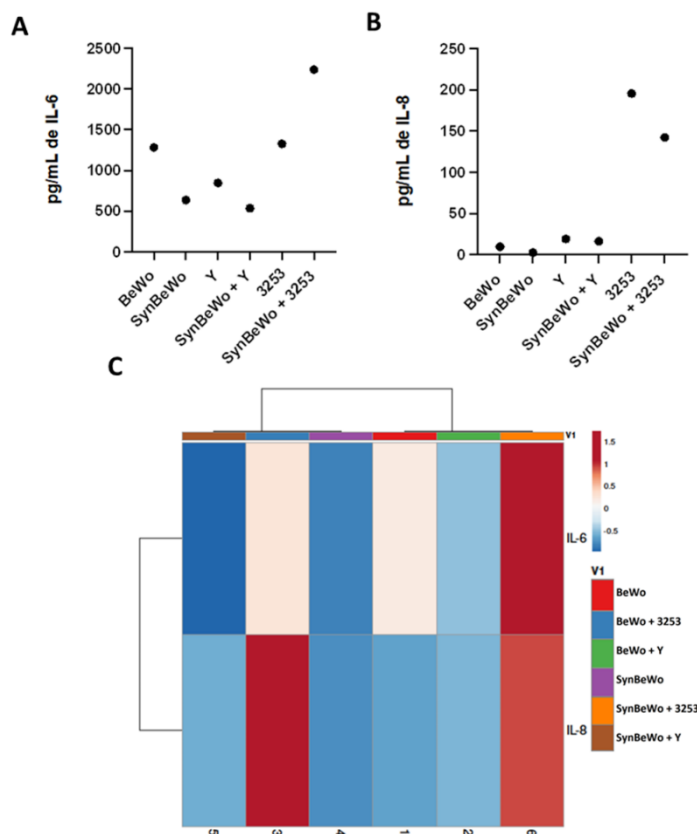
Quando comparada com a expressão de IL-6 e IL-8 em células BeWo não expostas aos parasitos e células BeWo expostas às cepas Y ou 3253, a infecção com a cepa 3253 induziu maior expressão dessas citocinas, que foi diminuída com o tratamento com 200 $\mu$ M de PTX. O tratamento com 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas também diminuiu a expressão de IL-6 pela cepa Y (Figura 45). Não foram detectadas quantidades significativas das citocinas TNF, IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-12.



**Figura 45- Expressão de IL-6 e IL-8 no sobrenadante das culturas de BeWo expostas às cepas Y ou 3253.** As culturas foram tratadas com 200 $\mu$ M de pentoxifilina (PTX) por 16 horas. (A) Expressão de IL-6 em pg/mL; (B) Expressão de IL-8 em pg/mL; (C) *Heatmap* da expressão das citocinas.

### 5.4.2 Células BeWo sincicializadas e infectadas com a cepa 3253 tem maior expressão de IL-6 e IL-8 do que células BeWo não sincicializadas

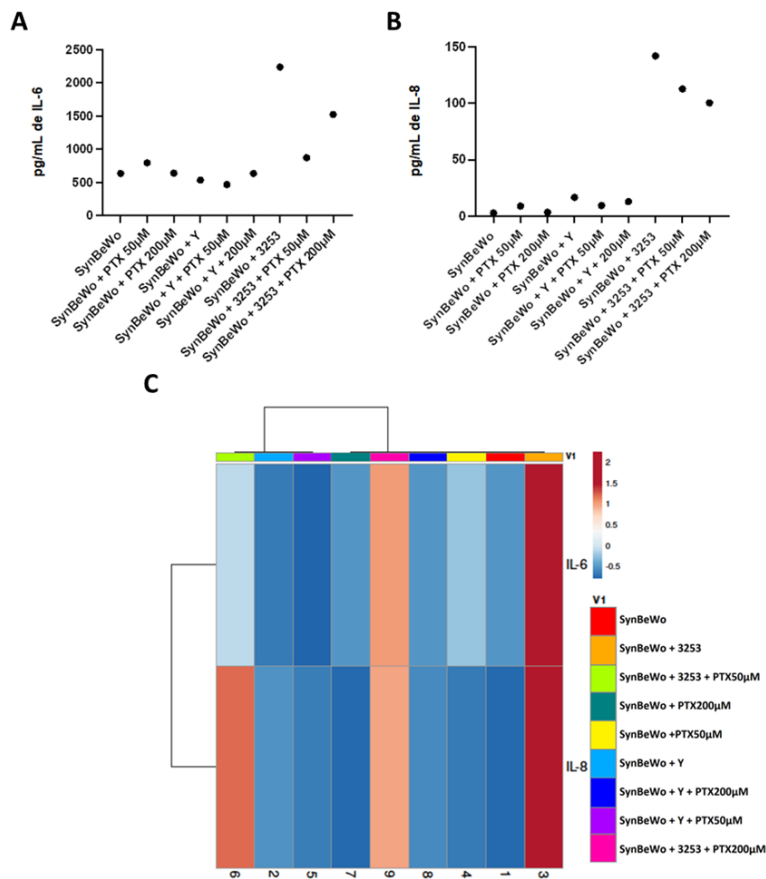
Quando comparadas as expressões de IL-6 e IL-8 entre células SynBeWo e BeWo, infectadas ou não, a sincicialização diminuiu a expressão de IL-6 em células não infectadas e em células infectadas com a cepa Y. Entre as células expostas à cepa 3253, as SynBeWo exibiram uma expressão maior de IL-6 e menor de IL-8 em comparação com as BeWo (Figura 46).



**Figura 46- Expressão de IL-6 e IL-8 no sobrenadante das culturas de BeWo e SynBeWo expostas às cepas Y ou 3253.** Células BeWo foram induzidas à sincicialização por 48h com 8-br-cAMP. (A) Expressão de IL-6 em pg/mL; (B) Expressão de IL-8 em pg/mL; (C) *Heatmap* da expressão das citocinas.

### 5.4.3 O tratamento com PTX por 16 horas diminui a expressão das citocinas IL-6 e IL-8 em SynBeWo infectadas com a cepa 3253

Foram comparadas as expressões das citocinas IL-6 e IL-8 em células SynBeWo tratadas ou não com PTX por 16 horas e expostas ou não às cepas Y ou 3253. A expressão de ambas as citocinas em células expostas à cepa 3253 diminuiu com o tratamento com PTX em relação às não tratadas. A expressão de IL-8 diminuiu com o tratamento com 50 $\mu$ M de PTX e mais ainda com 200 $\mu$ M de PTX, enquanto a de IL-6 diminuiu com 200 $\mu$ M de PTX e mais ainda com 50 $\mu$ M de PTX. Já em células expostas à cepa Y, a expressão de ambas as citocinas foi similar à de células não expostas, tratadas ou não com PTX (Figura 47).



**Figura 47- Expressão de IL-6 e IL-8 no sobrenadante das culturas de SynBeWo expostas às cepas Y ou 3253 e tratadas com pentoxifilina (PTX).** Células BeWo foram induzidas à sincicialização por 48h com 8-br-cAMP e tratadas com 50 ou 200 $\mu$ M de PTX por 16 horas. (A) Expressão de IL-6 em pg/mL; (B) Expressão de IL-8 em pg/mL; (C) *Heatmap* da expressão das citocinas.

## 6. DISCUSSÃO

A doença de Chagas congênita apresenta um desafio para a saúde pública. A testagem insuficiente de mulheres em idade fértil que residem em áreas endêmicas resulta na não detecção dos casos da doença durante a gravidez, o que acarreta a transmissão materno-fetal e a persistência da doença em regiões onde já tinha sido atingido o controle vetorial. A transmissão congênita também vem apresentando importância epidemiológica em países não endêmicos, através de migrações de mulheres infectadas de países endêmicos (CARLIER et al., 2019).

Até o momento não existem drogas recomendáveis para tratar a doença de Chagas durante a gravidez. O benzonidazol e o nifurtimox, convencionalmente utilizados para o tratamento da doença, apresentam reações adversas e seu potencial teratogênico é desconhecido (CARLIER et al., 2019). Com a elucidação de mecanismos envolvidos na infecção placentária por *T. cruzi*, é possível desenvolver novas formas de tratamento que diminuam a transmissão materno-fetal.

O TNF é uma citocina inflamatória importante no controle da parasitemia durante a fase aguda da doença de Chagas (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Porém, ela tem sido associada também à gravidade da doença por contribuir com a exacerbação da inflamação e, logo, destruição tecidual (TALVANI et al., 2004; TALVANI; TEIXEIRA, 2011). De forma importante, a inflamação exacerbada está também associada com destruição trofoblástica, comprometendo a função protetora da placenta (ALTEMANI; LANA; BITTENCOURT, 2000; JULIANO; BLOTTA; ALTEMANI, 2006). Nossos trabalhos anteriores demonstraram que a cepa 3253, indutora de um microambiente mais inflamatório em monócitos humanos, infecta mais células trofoblásticas BeWo do que a cepa Y (MAGALHÃES, 2017). Assim, neste trabalho a nossa hipótese foi que a produção TNF por células trofoblásticas aumenta a infecção destas células por *T. cruzi*, o que contribui para a transmissão materno-fetal.

As células BeWo, amplamente utilizadas em modelos para estudo de interações com células placentárias, podem ser utilizadas em sua forma individual ou em forma de sincício. Para obter-se esta forma, deve-se ativar estas células utilizando-se o AMPc (WICE et al., 1990). Altos níveis de AMPc levam à ativação de proteína kinase A e subsequente fosforilação de subunidades das junções tipo GAP, promovendo comunicação celular. Esta comunicação desencadeada pelos altos níveis de AMPc levam à fusão dos trofoblastos, formando estrutura

de sincício (GERBAUD; TASKÉN; PIDOUX, 2015; ORENDI et al., 2010). Em nosso trabalho, utilizamos células BeWo individualizadas (BeWo) e também sincicializadas (SynBeWo), por apresentarem características de estágios diferentes do desenvolvimento placentário (DRWAL; RAK; GREGORASZCZUK, 2018). Nossa proposta foi a de que, avaliando as características desencadeadas pelo parasito em células trofoblásticas com características de estágios distintos, poderíamos ganhar algum conhecimento sobre o que ocorre em diferentes fases do desenvolvimento placentário.

Primeiramente, nós comparamos a porcentagem e a intensidade de células BeWo e SynBeWo infectadas pelas cepas Y (TcII) ou 3253 (TcV) através da técnica histológica utilizando a coloração com Hematoxilina e eosina (HE). Nós pudemos observar, em concordância com estudos anteriores (MAGALHÃES, 2017), que ambas as cepas infectam células BeWo. Nós demonstramos também, pela primeira vez, a capacidade desses parasitos de infectar células BeWo sincicializadas. As cepas Y e 3253 infectaram porcentagem semelhante de células BeWo. Esses resultados diferem de nossos resultados anteriores, em que a cepa 3253 infectou maior porcentagem de células BeWo do que a cepa Y (MAGALHÃES, 2017). Esses resultados podem ser pelo menos parcialmente explicados pela diferença nas metodologias de coloração utilizadas: este estudo usou coloração histológica e o anterior, imunofluorescência. É possível que as diferentes técnicas tenham marcado o núcleo de *T. cruzi* de forma mais ou menos precisa. Outra possibilidade é a de que, apesar de termos usado parasitos da mesma cepa, a partida utilizada neste trabalho foi diferente da utilizada no trabalho anterior (feito há mais de 4 anos). Estudos adicionais comparando diferentes isolados e diferentes técnicas poderão esclarecer este ponto. A cepa Y apresenta maior virulência do que a cepa 3253 em camundongos (QUEIROGA et al., 2021). Medina et al., (2018) também demonstrou que a cepa Y infecta células BeWo, além de explantes placentários. Porém, essa cepa demonstrou menor infectividade e virulência quando comparada com uma cepa isolada de um caso congênito, demonstrando que a capacidade de infecção de células BeWo pode estar diretamente relacionada com a capacidade de transmissão congênita.

Quando comparamos a quantidade de parasitos por núcleo em células SynBeWo, as células infectadas pela 3253 apresentaram maior número do que as infectadas pela cepa Y. Esses dados podem apontar uma maior infecção pela cepa 3253 do sinciotrofoblasto, mas não do trofoblasto, do que pela cepa Y. Células SynBeWo apresentam diversas características que as diferenciam de BeWo, como produção de  $\beta$ -HCG (DRWAL; RAK; GREGORASZCZUK, 2018) e expressão de Syncitin-1 (HUANG et al., 2009), que são induzidas pela infecção por *T.*

*cruzi* (LIEMPI et al., 2014). Assim, é possível que a infecção pela cepa 3253 induza a diferenciação de células BeWo mais do que a infecção pela cepa Y. Além disso, é possível que a diferenciação da célula BeWo em sinciciotrofoblasto potencialize a interação com a cepa 3253 mais do que com a cepa Y.

Quando comparamos células BeWo com SynBeWo, houve uma tendência de células SynBeWo serem mais infectadas do que células BeWo, porém com menor intensidade. A maior porcentagem de infecção pode estar relacionada com a exposição ao parasito, já que, como dito acima, a exposição ao *T. cruzi* induz diferenciação em células BeWo. Essa hipótese é corroborada pelo fato de observarmos células multinucleadas em culturas de células BeWo infectadas e não tratadas com AMPc, ainda que com menos frequência do que nas culturas tratadas. Díaz-Luján et al., (2012) comparando a área de sinciciotrofoblastos e trofoblastos infectada pela cepa Tulahuen, observou que tripomastigotas ocupam uma menor porcentagem da área dos sinciciotrofoblastos, e que exposição a esse tipo de celular diminui a viabilidade dos parasitos. A menor intensidade de infecção observada por nós em SynBeWo corroboram esses resultados e demonstram que SynBeWo, como os sinciciotrofoblastos, apresentam maior capacidade de limitar a infecção por *T. cruzi*.

Outra metodologia utilizada para avaliar a infecção foi a marcação dos parasitos com o corante CFSE, que emite fluorescência quando internalizado pelo parasito. Logo, as células infectadas ou em contato firme com o parasito e, portanto, em vias de infecção, são associadas a esta fluorescência e podem ser quantificadas em citômetro de fluxo. Esta estratégia de uso de *T. cruzi* marcado com CFSE para avaliar infecção foi usada de forma pioneira por nosso grupo (SOUZA et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2017). Em concordância com os resultados observados com o HE, a porcentagem de células BeWo infectadas pelas cepas Y ou 3253 não foi diferente entre as cepas. Já a intensidade de infecção apresentou resultados diferentes: enquanto pela HE células infectadas com a cepa Y tinham maior intensidade de infecção do que as infectadas com a 3253, nesta análise, a intensidade de infecção/célula foi semelhante entre as duas cepas. Na citometria de fluxo, foi utilizada a intensidade média de fluorescência de CFSE para estimar a intensidade de infecção das células, ao invés da observação direta do parasito. Além disso, os experimentos de citometria foram repetidos três vezes em dias diferentes, podendo ocasionar pequenas variações que influenciam os resultados. Assim, mais estudos precisam ser realizados para comparar a capacidade de infecção de células BeWo pelas duas cepas.

Após avaliar a infecção, propusemos-nos a avaliar se o tratamento com a pentoxifilina (PTX) alteraria a infectividade das células BeWo. Utilizamos duas concentrações e duas condições para o tratamento com PTX: o uso de 50 e 200  $\mu\text{M}$ , por 1 hora antes e durante as 3 horas de exposição ao parasito, totalizando 4 horas; e por 1 hora antes, durante as 3 horas de exposição ao parasito e por todo o restante do período de incubação, totalizando 16 horas. Nossos resultados mostraram que o tratamento com PTX não alterou nem a porcentagem de células infectadas nem a infectividade pela cepa 3253. Porém, o tratamento com 200 $\mu\text{M}$  por 16 horas aumentou a porcentagem de SynBeWo infectadas pela cepa Y. A PTX é um derivado de metilxantina que atua diminuindo a transcrição do gene do TNF em monócitos e macrófagos alveolares (DOHERTY et al., 1991; MARQUES et al., 1999). Mjihdi et al. (2004) administrou PTX em camundongos grávidos infectados com a cepa Tehuantepec de *T. cruzi* e não observou diferenças significativas na parasitemia ou na carga parasitária na placenta desses animais, descartando o papel do TNF no controle da infecção. Esses resultados, somados com os nossos, podem indicar que o tratamento com PTX pode afetar as cepas de *T. cruzi* diferentemente.

Em seguida, nós nos propusemos a avaliar a influência da infecção pelas diferentes cepas na produção da citocina TNF por células BeWo. Apesar de uma aparente tendência no aumento da porcentagem de expressão da citocina, a infecção por nenhuma das duas cepas induziu aumento significativo de TNF. Esses resultados podem indicar que uma baixa produção de TNF por células BeWo. O TNF é uma citocina pró-inflamatória que, em conjunto com IFN- $\gamma$ , ativa a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), produzindo óxido nítrico que controla a multiplicação de *T. cruzi* (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; TRUYENS; CARLIER, 2017). Em níveis fisiológicos, na placenta, essa citocina é importante para regular a fusão celular e apoptose de citotrofoblastos, enquanto quantidades excessivas estão associadas com anormalidades reprodutivas como prematuridade, abortos, pré-eclâmpsia e infecções amnióticas (revisado por HAIDER; KNÖFLER, 2009). No modelo in vitro, a citocina induz a diferenciação de BeWo em SynBeWo, e aumenta a viabilidade celular (ELIESEN et al., 2022). Na infecção por *T. cruzi*, o TNF é importante no controle da transmissão congênita, sendo observados maiores níveis circulantes no sangue de mães não transmissoras do que de mães transmissoras (CARDONI; GARCÍA; DE RISSIO, 2004; GARCÍA et al., 2008). Em casos graves de doença de Chagas congênita, uma expressiva inflamação placentária é observada, acompanhada de altos níveis de TNF que contribuem para destruição trofoblástica (CARLIER; SCHIJMAN; KEMMERLING, 2020).

Mjihdi et al., (2004) analisando a expressão de TNF no sobrenadante de culturas de células placentárias de camundongos infectados com a cepa Tehuantepec, não encontrou diferenças significativas entre placentas infectadas e placentas não infectadas, evidenciando a capacidade constitutiva da placenta de produzir a citocina. Outros trabalhos com explantes placentários humanos observaram um aumento de TNF no sobrenadante das culturas infectadas com as cepas Ninoa, Inc-5 e Y (BARBOSA et al. 2022; CASTILLO et al., 2017). Esses resultados podem indicar que o aumento na expressão de TNF pela infecção por *T.cruzi* em células placentárias varia de acordo com a cepa, e também que pode haver uma limitação do modelo com células BeWo em reproduzir esse aumento. A placenta humana é composta por vilosidades coriônicas, revestidas por uma camada externa de sinciciotrofoblasto e uma camada de citotrofoblasto, mais interna. No interior das vilosidades, encontra-se o estroma viloso, separado do trofoblasto por uma lâmina basal. As vilosidades se ancoram na decídua basal, a parte materna da placenta (ARORA et al., 2017; KEMMERLING et al., 2019). Explantes placentários humanos contém diversos tipos celulares além dos trofoblastos, particularmente células de Hofbauer que estão presentes no estroma viloso. Essas células são responsáveis pela produção de citocinas, junto com os trofoblastos (BENIRSCHKE; DRISCOLL, 1967; CASTILLO et al., 2017). Assim, a produção de citocinas em explantes placentários é influenciada pela diversidade celular presente nesse modelo, em contraste com células BeWo que representam somente um tipo celular (LIEMPI et al., 2014).

A administração de PTX não alterou a expressão de TNF em células BeWo. Mjihdi et al., (2004) observaram uma diminuição significativa de TNF no sobrenadante de culturas de placentas de camundongos infectados quando tratados com a droga. A baixa porcentagem de expressão de TNF em células BeWo, infectadas com o parasito ou não, observada por nós pode ter dificultado a visualização de diferenças significativas. Para avaliar o efeito do bloqueio dessa citocina na infecção por *T.cruzi* em células BeWo, o ideal seria utilizar anticorpos monoclonais anti-TNF (ELLIOTT et al., 1993; MONACO et al., 2015). Nós optamos pelo uso da PTX pelo fato desse medicamento ser utilizado com sucesso no tratamento das lesões causadas pela leishmaniose, além de ser uma alternativa mais economicamente viável. Trabalhos anteriores de nosso grupo avaliando os efeitos dessa droga na leishmaniose tegumentar, mostraram que, embora a PTX combinada com o antimonial pentavalente tenha sido eficiente em reduzir o tempo de cura lesões mucosas refratárias ao tratamento convencional, de 360 para 150 dias, não houve redução da produção total da produção de TNF por células da lesão, mas sim dos macrófagos CD68+TNF+ (RODRIGUES DE FARIA et al., 2019). Assim, é possível que a



redução de TNF não seja o único fator sob a ação da PTX que pode auxiliar no controle da infecção.

Assim, o nosso próximo objetivo foi avaliar se a infecção pelas cepas Y ou 3253 altera a expressão dos receptores de TNF em células BeWo. Não observamos diferenças significativas na expressão de rTNF1 quando infectamos com nenhuma das duas cepas. Também não houve diferenças significativas entre células CFSE+ e células CFSE-. Assim, esses dados podem indicar que a infecção por *T. cruzi* não induz a expressão desse receptor em células BeWo. O rTNF1, junto com o rTNF2, pertence a superfamília de receptores de TNF e é expresso constitutivamente na maioria dos tecidos, enquanto o rTNF2 é encontrado predominantemente em células imunes. Os receptores interagem com a citocina e desencadeiam processos em comum, e processos distintos. O rTNF1 em geral está associado com vias que levam a respostas pró-inflamatórias e de morte celular, enquanto o rTNF2 está envolvido com apoptose, reparação tecidual e angiogênese. Ambos os receptores possuem domínios extracelulares que podem ser clivados, resultando na produção de receptores solúveis de TNF (rsTNF1 e rsTNF2) com capacidade de se ligar à citocina e neutralizá-la (HAIDER; KNÖFLER, 2009). rsTNF1 e rsTNF2 são encontrados abundantemente no sobrenadante de cultura de células BeWo e de citotrofblastos (KNÖFLER; STENZEL; HUSSLEIN, 1998), sugerindo um mecanismo constitutivo de regulação de TNF. García et al., (2008) encontrou níveis mais altos de rsTNF1 circulantes em grávidas infectadas do que em mulheres não grávidas e não infectadas. Assim, é possível que a infecção tenha gerado aumento na expressão do receptor e este tenha sido clivado. Futuros estudos serão realizados por nós para testar esta hipótese.

Houve uma diferença significativa na expressão desse receptor em células 3253 CFSE- quando tratadas com a maior concentração de PTX, por 16 horas, em relação a células não tratadas ou tratadas com 50 $\mu$ M. Esse tratamento induziu uma menor porcentagem, porém maior intensidade de expressão do rTNF1 nessas células. Esse fato merece cuidado ao ser analisado, considerando-se a baixa frequência das células BeWo expressando este receptor.

Observamos ainda que, quando células BeWo são tratadas com 200 $\mu$ M de PTX por 4 horas, a infecção pela cepa 3253 aumenta a porcentagem de expressão de rTNF1. Isso pode indicar uma tendência da infecção por essa cepa, mas não da infecção pela cepa Y, de induzir esse receptor. Células BeWo tratadas com 50 $\mu$ M de PTX por 16 horas apresentam maior porcentagem de expressão do receptor do que células CFSE- para as cepas Y ou 3253. Esses resultados observados somente quando há tratamento com PTX podem indicar que a droga altera a dinâmica da expressão de rTNF1 na presença de infecção por *T. cruzi*. Mjihdi et al.,

(2004) sugeriram que a infecção por *T.cruzi* poderia alterar a farmacocinética da PTX. Os efeitos da PTX em células BeWo e sobre a infecção dessas células por *T.cruzi* ainda precisam ser mais bem explorados.

Para o receptor rTNF2, foi observado uma maior porcentagem de expressão em células BeWo infectadas com qualquer das cepas, indicando que a infecção por *T.cruzi* aumenta a expressão desse receptor. Nós também mostramos que a infecção pela cepa Y induziu maior expressão do que a infecção pela cepa 3253. A infecção por essa cepa também induziu maior expressão em células infectadas tratadas com várias concentrações de PTX, mostrando uma tendência da infecção em aumentar a expressão do receptor. Nosso trabalho é o primeiro a mostrar essa relação entre a infecção por *T. cruzi* e aumento da expressão de rTNF2 em células BeWo. Quando células BeWo são expostas a AMPc, há um aumento na expressão do mRNA de rTNF2, indicando um possível papel desse receptor na diferenciação trofoblástica, mas sua função nessas células ainda não está bem elucidada (KNÖFLER; STENZEL; HUSSLEIN, 1998). Em sobrenadantes de placentas de camundongos, a infecção por *T.cruzi* aumenta a expressão de rsTNF2 (MJIHDI et al., 2004).

A porcentagem de células BeWo, infectadas ou não, expressando rTNF1 ou rTNF2 foi pequena. Essa pequena porcentagem pode ter sido resultado do uso da tripsina para soltar as células, que são aderentes, das placas de cultura para realizar a leitura no citômetro. A tripsina é uma enzima que pode interferir na expressão de moléculas de superfície, diminuindo receptores (NOWAK-TERPIŁOWSKA; ŚLEDZIŃSKI; ZEYLAND, 2021; TSUJI et al., 2017). Assim, seu uso pode ter diminuído a expressão dos receptores I e II de TNF em células BeWo. Além disso, como mencionado, é possível que os receptores expressos tenham sido clivados.

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória importante para controlar os danos causados pela inflamação exacerbada na doença de Chagas (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014; TRUYENS; CARLIER, 2017). Essa citocina pode regular os níveis de TNF através da indução dos rsTNF1 e 2, da inibição da expressão de TNF e da diminuição dos receptores de TNF (GARCÍA et al., 2008). Observamos que a porcentagem de expressão de IL-10 foi maior em células CFSE- do que células CFSE+, para as duas cepas. A intensidade de expressão também apresentou uma tendência a ser maior em células BeWo não expostas ao parasito do que células CFSE- tratadas com PTX. Esses resultados podem indicar que a exposição às cepas Y ou 3253 de *T.cruzi* induz uma diminuição na expressão de IL-10, apesar da maior porcentagem de expressão em células CFSE- para 3253 em relação a células BeWo não expostas ao parasito,

com 4h de tratamento com 200 $\mu$ M de PTX. O nível dessa citocina aumenta com a gravidez ou com a infecção por *T. cruzi*, porém mulheres grávidas infectadas possuem mesmas quantidades circulantes dessa citocina do que mulheres não grávidas e não infectadas (CARDONI; GARCÍA; DE RISSIO, 2004) Barbosa et al., (2022) observou uma diminuição na expressão de mRNA de IL-10 em explantes placentários humanos infectados com a cepa Inc-5, associada com lesões no tecido.

O fato de a infecção ou o tratamento com PTX terem alterado pouco a expressão de IL-10 pode refletir apenas que as células BeWo tem baixa capacidade de produção da mesma, mas também que sejam refratárias ao tratamento com PTX. Como mencionado, PTX age em genes controlados por NF $\kappa$ B e no caso de IL-10, GATA3 é o principal fator de transcrição associado à sua produção em células imunes (KUBO; MOTOMURA, 2012). O mecanismo de controle transcricional de IL-10 e TNF em células trofoblásticas, especialmente considerando-se a importância dessas células durante a gravidez, merece ser desvendado.

As análises discutidas anteriormente foram baseadas em análises direcionadas para uma dada medida, sem considerar as interações entre todas as variáveis. Análises não supervisionadas, que utilizam algoritmos de inteligência artificial buscando agrupamentos considerando graus de similaridade têm sido amplamente empregadas para analisar dados obtidos de análises multiparamétricas em citometria de fluxo (NEVES et al., 2021, 2022), assim como em outras estratégias (KOBAK; BERENS, 2019). *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding* (t-SNE) é uma das estratégias de análise não supervisionada, que identifica e cria *clusters* de células baseados em semelhanças entre elas e considerando-se as interações entre todas as variáveis analisadas. As análises utilizando-se desta estratégia mostram dados distintos daqueles obtidos em análises definidas, em que as interações entre as variáveis mostram agrupamentos com características distintas. A análise de nossos dados utilizando-se o t-SNE identificou populações de células intensamente infectadas com a cepa Y ou 3253 de *T. cruzi* expressando TNF, IL-10 e rTNF2 com mais intensidade do que as populações de BeWo somente. Já os *clusters* com intensidade média de infecção expressaram mais TNF, porém menos IL-10 e rTNF2 do que os de células BeWo somente. Esses dados indicam que a expressão de TNF, IL-10 e rTNF2 aumenta com o aumento da intensidade de infecção, mas o contato com menor quantidade do parasito pode diminuir a expressão de rTNF2 e IL-10.

O t-SNE também permitiu identificar que existem populações expostas por 4h a 50 ou 200 $\mu$ M de PTX que apresentam menor expressão de rTNF2 e IL-10 do que as populações não

expostas a PTX. Também foram identificadas populações expostas a maior concentração de PTX por 16h expressando mais rTNF1 e menos TNF. Esses resultados indicam que, apesar das análises tradicionais não identificarem diferenças na expressão de citocinas e receptores entre os diferentes tratamentos com PTX, o t-SNE demonstrou que o uso da droga em células BeWo leva a alterações nesses parâmetros.

Também foram identificadas populações numerosas de células tratadas por 16 horas com PTX apresentando menor infecção pela cepa 3253 do que as não tratadas, mostrando que a droga pode inibir a infecção por essa cepa em subpopulações de células trofoblásticas. Assim, pode ser um potencial tratamento para prevenir a transmissão congênita. Mais estudos analisando a capacidade dessa droga de reduzir a infecção de células BeWo por *T. cruzi*, utilizando cepas isoladas de casos congênitos e maiores concentrações de PTX podem nos ajudar a elucidar essa questão. Estes resultados mostram a necessidade de obter-se uma melhor caracterização das subpopulações de BeWo para melhor compreender os efeitos de PTX nos diferentes parâmetros.

Nas análises de CBA, somente foi possível identificar quantidades suficientes das citocinas IL-6 e IL-8. A infecção pela cepa 3253 induziu a produção das duas citocinas, enquanto a infecção pela cepa Y induziu a redução de IL-6 e um leve aumento de IL-8. O tratamento com PTX mostrou uma tendência em reduzir a produção das citocinas em células BeWo e em SynBeWo infectadas com 3253. Células SynBeWo, exceto as infectadas por 3253, produziram uma menor quantidade de IL-6 do que células BeWo. Células SynBeWo infectadas com 3253 produziram mais IL-6 e IL-8 do que células BeWo.

A IL-6 é uma citocina com propriedades pró e anti-inflamatórias, apresentando características similares a hormônios que exercem efeitos homeostáticos (HUNTER; JONES, 2015). Essa citocina também está associada com a diferenciação e proliferação do trofoblasto (KEMMERLING et al., 2019). Células do sangue de mães infectadas não transmissoras expressam níveis maiores dessa citocina em resposta a *T. cruzi* do que células de mães não infectadas, e essa capacidade é herdada pelo feto (VEKEMANS et al., 2000). Semelhante aos nossos achados com a cepa Y, Barbosa et al. (2022) observaram menores quantidades das citocinas IL-6 no sobrenadante de culturas de explantes placentários humanos infectados com as cepas Ninoa ou Inc-5.

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversos tipos celulares com capacidade de recrutar neutrófilos, basófilos e células T durante o processo de infecção

(BRENNAN; ZHENG, 2007). Castillo et al., (2017) observou um aumento na expressão dessa citocina em explantes placentários infectados pela cepa Y.

Não foram detectadas quantidades suficientes das citocinas IL-10, IL-12, TNF e IL-1 $\beta$  no sobrenadante das culturas. Diversos experimentos identificaram essas citocinas no sobrenadante de cultura de explantes placentários ou trofoblastos infectados por *T. cruzi* (BARBOSA et al., 2022; CASTILLO et al., 2017; MJIHDI et al., 2004). Essas diferenças para com os nossos resultados podem ser devidas às diferentes técnicas utilizadas, uma vez que as citocinas foram medidas por ELISA nesses experimentos. Além disso, nossos resultados são limitados pelo fato de terem sido realizados em apenas uma amostra, não sendo possível realizar testes estatísticos para comparar os dados. Mais estudos serão realizados para obtermos dados mais robustos nesta área.

Existe ainda muito a ser elucidado sobre os mecanismos da transmissão congênita de *T. cruzi*. Diferenças entre a capacidade das cepas de *T. cruzi* para infectar células sincicializadas e não sincicializadas ainda precisam ser elucidadas. Nossos trabalhos mostram o envolvimento principalmente do receptor 2 de TNF na infecção de células trofoblásticas BeWo. Além disso, mostram uma possível correlação entre a infecção pela cepa 3253, mas não pela cepa Y, na produção de citocinas IL-6 e IL-8 por essas células. A utilização de cepas isoladas de casos congênitos de doença de Chagas, analisando sua capacidade de infectar células BeWo e SynBeWo e de induzir citocinas, pode auxiliar a elucidar os mecanismos envolvidos na transmissão de *T. cruzi*. A análise de hormônios  $\beta$ -HCG, progesterona e estradiol, produzidos por células BeWo e SynBeWo, pode responder questões relacionadas a alterações das funções normais de células trofoblásticas frente à infecção e tratamento com PTX.

## 7. CONCLUSÕES

- As cepas Y (TcII) e 3253 (TcV) de *T. cruzi* são capazes de infectar células SynBeWo;
- O receptor II de TNF é induzido em células BeWo após a infecção pelas cepas Y ou 3253;
- A infecção pelas cepas Y ou 3253 altera a expressão de citocinas IL-10 e TNF e de receptores de TNF em células BeWo, dependendo a intensidade de infecção;
- A infecção pela cepa 3253 induz a expressão de IL-6 e IL-8 em células BeWo e SynBeWo;
- O tratamento com 50 e 200 $\mu$ M de pentoxilifina (PTX) não reduz a infecção de células BeWo com parasitos das cepas Y ou 3253;
- O tratamento com PTX não inibe a expressão de TNF e seus receptores em células BeWo, mas leva a uma diminuição da expressão de IL-6 e IL-8 nessas células e em células SynBeWo.

## REFERÊNCIAS

- ALTEMANI, A. M.; LANA, A. M.; BITTENCOURT, A. L. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 2, p. 319–324, 1 fev. 2000.
- ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- ANNONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. suppl 1, p. 429–432, set. 1999.
- APT, W. Treatment of Chagas disease. Em: **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 751–771.
- ARORA, N. et al. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 5, p. 561–567, maio 2017.
- BALOUZ, V.; AGÜERO, F.; BUSCAGLIA, C. A. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. **Advances in Parasitology**, v. 97, p. 1–45, 2017.
- BARBOSA, C. G. et al. Congenital transmission of Mexican strains of *Trypanosoma cruzi* Tc1a: Interaction between parasite and human placental explants. **Parasitology**, v. 149, n. 3, p. 418–426, 24 mar. 2022.
- BENIRSCHKE, K.; DRISCOLL, S. G. The Pathology of the Human Placenta. Em: **Placenta**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1967. p. 97–571.
- BITTENCOURT, A. L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 5, p. 403–408, out. 1992.
- BRENIÈRE, S. F.; WALECKX, E.; BARNABÉ, C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, 29 ago. 2016.

BRENNAN, K.; ZHENG, J. Interleukin 8. Em: **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**. [s.l.] Elsevier, 2007. p. 1–4.

BRITO, G. et al. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 617–620, 2014.

BURGOS, J. M. et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 12, p. 1319–1327, out. 2007.

CARDONI, R. L.; GARCÍA, M. M.; DE RISSIO, A. M. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, mar. 2004.

CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: An update. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363–368, 2015.

CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 10, p. e0007694, 24 out. 2019.

CARLIER, Y.; SCHIJMAN, A. G.; KEMMERLING, U. Placenta, *Trypanosoma cruzi*, and Congenital Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 7, n. 4, p. 172–182, 4 dez. 2020.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 103–115, 8 jun. 2015.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. Em: **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 517–559.

CASTILLO, C. et al. Ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, n. 1, 1 jul. 2017.



CHEN, H. et al. Cytokit: A Bioconductor Package for an Integrated Mass Cytometry Data Analysis Pipeline. **PLOS Computational Biology**, v. 12, n. 9, p. e1005112, 23 set. 2016.

DIAS, J. C. P. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Em: **Arthropod Borne Diseases**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

DOHERTY, G. M. et al. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery**, v. 110, n. 2, p. 192–8, ago. 1991.

DRWAL, E.; RAK, A.; GREGORASZCZUK, E. Co-culture of JEG-3, BeWo and syncBeWo cell lines with adrenal H295R cell line: an alternative model for examining endocrine and metabolic properties of the fetoplacental unit. **Cytotechnology**, v. 70, n. 1, p. 285–297, 1 fev. 2018.

DUASO, J. et al. *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta. **Placenta**, v. 31, n. 8, ago. 2010.

ELIESEN, G. A. M. et al. Effects of tumor necrosis factor on undifferentiated and syncytialized placental choriocarcinoma BeWo cells. **Toxicology in Vitro**, v. 80, 1 abr. 2022.

ELLIOTT, M. J. et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor  $\alpha$ . **Arthritis & Rheumatism**, v. 36, n. 12, p. 1681–1690, dez. 1993.

ESSAYAN, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 5, p. 671–680, nov. 2001.

FARIA, D. R. et al. Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, dez. 2005.

GARCÍA, M. M. et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 3, p. 499–503, mar. 2008.

GERBAUD, P.; TASKÉN, K.; PIDOUX, G. Spatiotemporal regulation of cAMP signaling controls the human trophoblast fusion. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 15 set. 2015.

HAIDER, S.; KNÖFLER, M. Human Tumour Necrosis Factor: Physiological and Pathological Roles in Placenta and Endometrium. **Placenta**, v. 30, n. 2, p. 111–123, fev. 2009.

HERMANN, E. et al. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Is Associated with Maternal Enhanced Parasitemia and Decreased Production of Interferon- $\gamma$  in Response to Parasite Antigens. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 7, abr. 2004.

HUANG, F. D. et al. Regulation of Protein Expression and Function of OCTN2 in Forskolin-Induced Syncytialization in BeWo Cells. **Placenta**, v. 30, n. 2, p. 187–194, fev. 2009.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nature Immunology**, v. 16, n. 5, p. 448–457, 21 maio 2015.

JULIANO, P. B.; BLOTTA, M. H. S. L.; ALTEMANI, A. M. A. ICAM-1 is Overexpressed by Villous Trophoblasts in Placentitis. **Placenta**, v. 27, n. 6–7, p. 750–757, jun. 2006.

KEMMERLING, U. et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 14 ago. 2019.

KNÖFLER, M.; STENZEL, M.; HUSSLEIN, P. Shedding of tumour necrosis factor receptors from purified villous term trophoblasts and cytotrophoblastic BeWo cells. **Human Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2308–2316, 1 ago. 1998.

KOBAK, D.; BERENS, P. The art of using t-SNE for single-cell transcriptomics. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 5416, 28 dez. 2019.

KUBO, M.; MOTOMURA, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.

LIEMPI, A. et al. *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1035–1042, 2014.

LUQUETTI, A. et al. O4-3.5 The national survey of seroprevalence for evaluation of the control of chagas disease in Brazil (2001-2008). **Journal of Epidemiology & Community Health**, v. 65, n. Suppl 1, 1 ago. 2011.

LUQUETTI, A. O. et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 369–376, 2015.

MACHADO, P. R. L. et al. Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 6, 15 mar. 2007.

MAGALHÃES, L. M. D. **Avaliação dos efeitos da infecção por diferentes isolados de *Trypanosoma cruzi* em características fenotípicas e funcionais de neutrófilos, monócitos e linfócitos humanos**. Tese (Doutorado)—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 9, p. e711–e722, set. 2022.

MARQUES, L. J. et al. Pentoxifylline Inhibits TNF-  $\alpha$  Production from Human Alveolar Macrophages. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 159, n. 2, p. 508–511, 1 fev. 1999.

MEDINA, L. et al. Differential infectivity of two *Trypanosoma cruzi* strains in placental cells and tissue. **Acta Tropica**, v. 186, p. 35–40, 1 out. 2018.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W566–W570, 1 jul. 2015.

MJIHDI, A. et al. Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 1–2, p. 58–64, maio 2004.

MONACO, C. et al. Anti-TNF therapy: past, present and future. **International Immunology**, v. 27, n. 1, p. 55–62, 1 jan. 2015.

NDE, P. N. et al. Silencing of the Laminin  $\gamma$ -1 Gene Blocks *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, mar. 2006.

NEVES, E. G. A. et al. Systemic cytokines, chemokines and growth factors reveal specific and shared immunological characteristics in infectious cardiomyopathies. **Cytokine**, v. 148, p. 155711, dez. 2021.

NEVES, E. G. A. et al. T-Cell Subpopulations Exhibit Distinct Recruitment Potential, Immunoregulatory Profile and Functional Characteristics in Chagas versus Idiopathic Dilated Cardiomyopathies. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 9, 2 fev. 2022.

NIELEBOCK, M. A. P. et al. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, 2 dez. 2020.

NOWAK-TERPIŁOWSKA, A.; ŚLEDZIŃSKI, P.; ZEYLAND, J. Impact of cell harvesting methods on detection of cell surface proteins and apoptotic markers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 2, 2021.

ORENDI, K. et al. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. **REPRODUCTION**, v. 140, n. 5, p. 759–766, nov. 2010.

PEREIRA, I. R. et al. Tumor Necrosis Factor Is a Therapeutic Target for Immunological Unbalance and Cardiac Abnormalities in Chronic Experimental Chagas' Heart Disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–16, 2014.

PICADO, A. et al. The burden of congenital Chagas disease and implementation of molecular diagnostic tools in Latin America. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 5, p. e001069, out. 2018.

QUEIROGA, T. B. D. et al. Virulence of *Trypanosoma cruzi* Strains Is Related to the Differential Expression of Innate Immune Receptors in the Heart. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 15 jul. 2021.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, jun. 2012.

RIVERA, M. T. et al. High tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant mice and increased TNF-alpha gene transcription in their offspring. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, fev. 1995.

- RODARI, P. et al. Congenital Chagas disease in a non-endemic area: Results from a control programme in Bergamo province, Northern Italy. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 25, p. 31–34, 1 set. 2018.
- RODRIGUES, D. B. R. et al. *In Situ* Expression of Regulatory Cytokines by Heart Inflammatory Cells in Chagas' Disease Patients with Heart Failure. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- RODRIGUES DE FARIA, D. et al. In Situ Cellular Response Underlying Successful Treatment of Mucosal Leishmaniasis with a Combination of Pentavalent Antimonial and Pentoxifylline. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 17 jun. 2019.
- RODRIGUES-DOS-SANTOS, Í. et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, 12 nov. 2018.
- SCAPELLATO, P. G.; BOTTARO, E. G.; RODRÍGUEZ-BRIESCHKE, M. T. Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 107–109, abr. 2009.
- 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**, v. 72, n. 9, p. 5283–5291, set. 2004.
- TALVANI, A. et al. Elevated Concentrations of CCL2 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Chagasic Cardiomyopathy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 7, p. 943–950, abr. 2004.
- TALVANI, A.; TEIXEIRA, M. M. Inflammation and Chagas Disease. Em: WEISS, L.; TANOWITZ, H. (Eds.). **Advances in Parasitology**. 1st. ed. [s.l.] Academic Press, 2011. v. 76p. 171–194.
- TAVARES DE OLIVEIRA, M. et al. Quantification of parasite burden of *Trypanosoma cruzi* and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 6, 4 jun. 2020.
- TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 2, n. 1, p. 12, 28 out. 2003.

TORRICO, F. et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 70, n. 2, p. 201–9, fev. 2004.

TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Protective host response to *Trypanosoma cruzi* and its limitations. Em: **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 579–604.

TSUJI, K. et al. Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 6, p. 1089–1102, 9 jun. 2017.

VEKEMANS, J. et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* Infection Upregulates Capacity of Uninfected Neonate Cells To Produce Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5430–5434, set. 2000.

VIOTTI, R. et al. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 2, 10 mar. 2009.

VIRREIRA, M. et al. Comparison of *Trypanosoma cruzi* Lineages and Levels of Parasitic DNA in Infected Mothers and Their Newborns. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 1, p. 102–106, 1 jul. 2007.

WICE, B. et al. Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 186, n. 2, fev. 1990.