

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência da origem do tripomastigota e da via de inoculação na evolução da infecção da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c

KAROLINA RIBEIRO GONÇALVES

Orientadora: Maria Terezinha Bahia  
Co-orientador: Sérgio Caldas

Ouro Preto,  
Julho de 2018

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

**Influência da origem do tripomastigota e da via de inoculação na evolução da infecção da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c**

Karolina Ribeiro Gonçalves

Orientadora: Maria Terezinha Bahia

Co-orientador: Sérgio Caldas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários

Ouro Preto,  
Julho 2018

G586i

Gonçalves, Karolina Ribeiro.

Influência da origem do tripomastigota e da via de inoculação na evolução da infecção da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c [manuscrito] / Karolina Ribeiro Gonçalves. - 2018.

100f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Profª. Dra. Maria Terezinha Bahia.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Chagas, Doença de. 3. Coração - Infecções. I. Bahia, Maria Terezinha. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.937



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS**



**ATA DE DEFESA DE TESE**

Aos 02 dias do mês de julho do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de tese da doutoranda Karolina Ribeiro Gonçalves, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Maria Terezinha Bahia (Presidente - UFOP), pela Profa. Luciana de Oliveira Andrade (Membro - Externo), pelo Prof. Max Jean de Ornelas Toledo (Membro - Externo), pela Profa. Paula Melo de Abreu Vieira (Membro - UFOP), pelo Prof. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (Membro - Externo). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de tese, concedeu à doutoranda Karolina Ribeiro Gonçalves 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Influência da Origem do Tripomastigota e da Via de Inoculação Na Evolução da Infecção da Cepa Colombiana de Trypanosoma Cruzi em Camundongos Balb/C", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da tese. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a doutoranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da tese deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela doutoranda. Ouro Preto, 02 de julho de 2018.

Presidente: Maria Terezinha Bahia

Membro: Luciana de Oliveira Andrade

Membro: Max Jean de Ornelas Toledo

Membro: Paula Melo de Abreu Vieira

Membro: Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto

Doutorando: Karolina Gonçalves

Aos meus pais, amores da minha vida, meus maiores exemplos e incentivadores. Esse título também é de vocês. Ao Alvaro por ser meu parceiro em casa e no trabalho, por sempre me acalmar e ter a confiança que eu mesma não tinha. À Terezinha Bahia, por acreditar em minha capacidade em chegar tão longe.

A Deus, por todo amor e toda força: amparo, fortaleza e esperança!

A professora e amiga Maria Terezinha Bahia por acreditar em minha capacidade, por mostrar o quão grandiosa é a pesquisa científica. Por me ensinar a contornar os problemas e por estar sempre presente!

Ao meu co-orientador Sérgio por todo auxílio durante o projeto! Por sempre responder minhas dúvidas e me ensinar bastante.

Aos meus queridos pais, por sempre torcerem e acreditarem em mim! Por todas as orações e ligações que acalmavam meu coração agitado!

Ao Alvaro, meu companheiro de vida e profissional! Sem você eu certamente não conseguiria terminar esse doutorado! Obrigada pela paciência com minha histeria e por me ajudar sempre!

Aos meus irmãos que mesmo de longe sempre mandavam vibrações positivas, sempre esperavam o melhor de mim e isso me incentivava a ser cada dia melhor! Meus sobrinhos por fazerem minha vida mais alegre!!

Aos meus sogros por todo suporte e carinho!

A Ana Lia: amiga, marida e confidente! Por fazer essa jornada mais leve, por sempre dividir conhecimento e dúvidas também!

Aos amigos do lab Doença de Chagas: Suianne, Jéssica, Géssica, Priscila, Breno, Lidiane, Ruan, Laís e Renata por toda ajuda principalmente pelas extensivas necropsias! Vocês foram essenciais na realização deste projeto. Ao Ivo e Lívia por dividirem conhecimento e por sempre estarem disponíveis!

A Ludmilla por toda ajuda e amizade e por sempre torcer por mim! A Irisa, Vívian e Cássio pela boa convivência!

Aos colaboradores do projeto Carol e Fernando, por além de ajudarem na execução do projeto (e muito!) tornarem este processo mais alegre e descontraído.

Ao Professor Alexandre Barbosa Reis por ceder o laboratório para realização de experimentos. A Rosália pela ajuda com os emblocamentos e por sempre estar disponível a ajudar! A Lú por sempre ter boa vontade em ajudar!

As minhas irmãs de alma da república Feijão com Arroz por serem refúgio certo nas horas incertas! Por todas as palavras de carinho e todo apoio!

Aos tios, tias e primos por todas as vibrações positivas e incentivos, em especial a minha tia/madrinha Rosa por sempre se preocupar e rezar por mim!

Às best forever pela paciência de sempre, pelas palavras amigas e por todo incentivo!

Aos colegas que fiz no biotério: Chiquinha, Estela, Seu Antônio, Márcio, Patrícia, Lílian dentre tantos outros! A dona Nieta da portaria por sempre ter um bom dia super especial! Obrigada por sempre terem um sorriso pra dar e por serem sempre prestativos.

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma doença negligenciada que afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, especialmente na América Latina. O *T. cruzi* pode ser transmitido pelas vias vetorial, oral, transfusional, congênita, dentre outras. Nas últimas décadas tem sido dada maior atenção à infecção oral, devido a ocorrência de frequentes surtos de transmissão oral, especialmente na região Amazônica. Nestes surtos foram observados sinais clínicos bem diferentes e mais severos dos encontrados usualmente nas áreas de transmissão vetorial. Neste contexto, é de extrema relevância o estudo da influência da via de inoculação na evolução da fase aguda da infecção por *T. cruzi* visando o melhor entendimento da evolução clínica mais grave e da maior taxa de mortalidade observada em indivíduos infectados pela via oral. Este estudo avaliou a taxa de infecção, a carga parasitária, as lesões teciduais, aspectos da resposta imune celular e humoral de animais inoculados através das vias oral, intragástrica, cutânea, ocular e intraperitoneal com tripomastigotas metacíclicos (TM) obtidos de cultura acelular ou tripomastigotas sanguíneos (TS) da cepa colombiana. Esta cepa, pertence à DTU (Unidades Taxonômicas Distintas) TcI, que tem sido associada à surtos agudos de doença de Chagas. Os resultados mostraram que a infecção de camundongos BALB/c por TS induz uma maior parasitemia em relação aos TM, considerando a mesma via de inoculação. De forma diferente, na quantificação do parasitismo por qPCR em amostras de tecidos (coração, baço, fígado, músculo esquelético, bochecha, língua, estômago, jejuno, colón e cérebro) foi detectado, de maneira geral, parasitismo tecidual mais intenso nas amostras coletadas de animais inoculados com TM em relação à TS, considerando a mesma via de inoculação. O parasitismo foi mais intenso e frequente nos tecidos musculares cardíaco e esquelético dos animais inoculados com TS. Entre os animais inoculados com TM o parasito foi detectado em todos os tecidos avaliados, sendo a maior carga parasitária detectada no fígado e no baço, com exceção dos animais inoculados com TM via cutânea, onde o parasitismo foi detectado esporadicamente e em baixos níveis em todos os tecidos analisados. De forma interessante, o parasito foi detectado com maior frequência no cérebro dos animais inoculados com TM em relação à TS, tendo sido detectado em 42 a 100% dos animais inoculados com TM pelas diferentes vias e em no máximo 30% dos animais que receberam TS. Em seguida foi analisada, quantitativamente, a intensidade da inflamação nos tecidos cardíaco, hepático e esplênico dos animais. Apesar do parasitismo mais intenso detectado nos animais infectados por TM, a intensidade da inflamação nestes tecidos foi maior, de forma geral, nos animais inoculados com TS, especialmente naqueles inoculados via IP. Estes resultados estão de acordo com os maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  detectados nestes animais aos 15 dias após a infecção. Os níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  permaneceram significativamente maiores nos animais inoculados por TS e TM aos 30 dias após a infecção, em relação aos animais do grupo controle não infectado, em concordância com o aumento da intensidade da inflamação nos diferentes tecidos analisados neste período. De forma geral, os resultados deste estudo mostraram uma marcada influência da via de inoculação e da origem do tripomastigota na infecção de camundongos, tendo sido detectado maior parasitismo sanguíneo, lesões teciduais mais intensas e maiores níveis séricos das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos animais inoculados com TS, em contraste com um parasitismo tecidual mais intenso e mais frequente (especialmente no cérebro) dos animais que receberam TM, considerando a mesma via de inoculação.



Chagas disease, caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a neglected disease that affects about 6-7 million people worldwide, mostly in Latin America. *T. cruzi* is transmitted to humans through the infected faeces of the blood-sucking triatomine bug, blood transfusions, congenital transmission, oral transmission, among others. In recent decades, more attention has been given to oral infection, due to the occurrence of frequent outbreaks of oral transmission, especially in the Amazon region. In these outbreaks were observed very different and more severe clinical signs than those usually found in the areas of vector transmission. In this context, studies designed to evaluate of the influence of the inoculation route on the evolution of the acute phase of *T. cruzi* infection may be very relevant. This study evaluated the infection rate, parasite load, tissue lesions, aspects of the cellular and humoral immune response of animals inoculated by oral, intragastric, cutaneous, ocular and intraperitoneal routes with metacyclic trypomastigotes (MT) obtained from acellular culture or blood trypomastigotes (BT) of the Colombian strain. This strain belongs to DTU TcI, which has been associated with acute outbreaks of Chagas disease. Our results showed that the infection of BALB/c mice by BT induces higher levels of parasitemia in relation to MT, considering the same route of inoculation. Differently, the parasite load, detected by qPCR, in tissue samples (heart, spleen, liver, skeletal muscle, cheek, tongue, stomach, jejunum, colón and brain) was generally higher in samples collected from animals inoculated with MT in relation to BT, considering the same route of inoculation. The parasitism was more intense and frequent in the cardiac and skeletal muscle tissues of animals inoculated with BT. Among animals inoculated with MT the parasite was detected in all tissues evaluated, with the highest parasite load detected in the liver and spleen, except for the animals inoculated by cutaneous route, where parasitism was detected sporadically and at low levels in all the analyzed tissues. Interestingly, the parasite was detected more frequently in the brain of animals inoculated with MT compared to BT, being detected in 42 to 100% of the animals inoculated with MT through different routes and only up to of 30% of the animals that inoculated with BT. Next, the intensity of the inflammation in the cardiac, hepatic and splenic tissues was quantitatively analyzed. Despite the greater tissue parasitism detected in animals inoculated with MT, the tissue inflammation was generally more intense in those inoculated with BT, especially among animals inoculated through the intraperitoneal route. These results are in line with the higher serum levels of pro-inflammatory cytokines, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , detected in these animals at 15 days post-infection. The cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  persist in significantly higher levels in animals inoculated by BT and MT at 30 days post-infection, in relation to not-infected animals. These results are in agreement with the increased intensity of inflammation detected in most of tissues analyzed in this period. In general, our results showed an evident influence of the inoculation route as well as the trypomastigote origin on the outcome of the infection by Colombian *T. cruzi* strain. Higher levels of blood parasitism, tissue lesions and serum cytokines (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) were detected in animals inoculated with BT. In contrast a more intense and frequent tissue parasitism was detected among those that received MT, considering the same route of inoculation.

Figura 1: Parasitemia média obtida de camundongos BALB/c inoculados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). (A) curva de parasitemia dos animais infectados com TS; (B) área sob a curva de parasitemia dos animais infectados por TS; (C) curva de parasitemia dos animais infectados com TM; (D) área sob a curva de parasitemia de cada um dos grupos experimentais infectados com TM..... 45

Figura 2: Faixa de linearidade da PCR em tempo real quantitativa. Curvas de amplificação da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* geradas a partir de diluições seriadas 1:10 do DNA do parasito em 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do DNA dos diferentes tecidos, partindo-se da concentração inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/25  $\mu\text{g}$  de DNA, os quais foram submetidos à quantificação do parasito e detecção do controle endógeno (TNF- $\alpha$ ) em reações multiplex. Os quadrados coloridos das faixas de linearidade indicam as amplificações das diferentes concentrações do DNA do parasito nos variados tecidos, conforme representado nas legendas..... 46

Figura 3: Curvas de amplificação geradas a partir de 5 diluições seriadas (1:10) do DNA de epimastigotas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* em 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA dos respectivos tecidos, partindo-se de  $1 \times 10^6$  epimastigotas/25  $\mu\text{g}$  de DNA. As curvas geradas foram utilizadas na quantificação do DNA do parasito e detecção do controle endógeno em reações multiplex no (A) jejuno (azul claro), músculo esquelético (verde claro), fígado (laranja), coração (vermelho) e baço (verde escuro), (B) língua (vermelho), bochecha (laranja), cérebro (verde escuro), intestino grosso (verde claro) e estômago (azul claro). Em ambas as figuras as linhas em azul indicam a amplificação do controle endógeno (TNF- $\alpha$ ) dos padrões gerados ..... 47

Figura 4: Parasitismo detectado por PCR em tempo real nos fígado de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) do *Trypanosoma cruzi* (cepa Colombiana) pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 (A) e 30 dai (B)..... 49

Figura 5: Parasitismo detectado por PCR em tempo real no baço de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) do *Trypanosoma cruzi* (cepa Colombiana) pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 (A) e 30 dai (B)..... 50

Figura 6: Parasitismo detectado por PCR em tempo real no coração de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) do *Trypanosoma cruzi* (cepa Colombiana) pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 (A) e 30 dai (B)..... 52

Figura 7: Quantificação do número de células no tecido hepático de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) da cepa Colombiana do *T. cruzi* avaliados aos 15 (A) e 30 dai (B) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU)..... 56

Figura 8: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral, cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra=100µm..... 57

Figura 9: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral, cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 30 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra =100µm ..... 57

Figura 10: Quantificação da área média dos folículos linfoides no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (dai) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU)..... 59

Figura 11: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral, cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 100µm ..... 60

Figura 12: Fotomicrografias representativas realizadas na objetiva de 10x de cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral, cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 100µm..... 60

Figura 13: Quantificação de núcleos celulares no músculo cardíaco de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) da cepa Colombiana do *T. cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (dai) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) ..... 62

Figura 14: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de coração de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral, cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 50µm..... 63

Figura 15: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de coração de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral, cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 50µm..... 63

Figura 16: Peso médio do baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*

após a infecção pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). (A) 15 dias após a infecção (dai); (B) 30 dai..... 66

Figura 17: Peso médio do fígado de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* após a infecção pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). (A) 15 dias após a infecção (dai); (B) 30 dai..... 67

Figura 18: Níveis séricos de citocinas obtidos através de CBA em de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (dai) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. A e B níveis de IFN- $\gamma$ . C e D níveis de TNF- $\alpha$ . E e F níveis de IL-10.....69

Figura 19: Absorbância média de imunoglobulinas determinadas através de ELISA nos soros de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (dai) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. A e B imunoglobulina da classe IgG. B e C imunoglobulina da classe IgG2a. D e F imunoglobulina da classe IgG2b. G e H imunoglobulina da classe IgM..... 72

- Tabela 1: Avaliação da influência do tempo de manutenção do parasito em meio de cultura acelular e a infectividade e virulência de tripomastigotas metacíclicos da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c ..... 41
- Tabela 2: Média e desvio padrão de parâmetros parasitológicos em camundongos infectados pelas vias intraperitoneal, intragátrica, oral, cutânea e ocular por tripomastigotas sanguíneos ou metacíclicos da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*..... 43
- Tabela 3: Perfil do parasitismo tecidual de camundongos BALB/c inoculados com tripomastigotas metacíclicos ou sanguíneos da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* de acordo com cada via de inoculação aos 15 e 30 dias de infecção ..... 54
- Tabela 4: Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no cérebro, língua, bochecha, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e músculo esquelético de camundongos BALB/C infectados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em diferentes vias de inóculo..... 64
- Tabela 5: Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no cérebro, língua, bochecha, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e músculo esquelético de camundongos BALB/C infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em diferentes vias de inóculo ..... 65

B.O.D.	Demanda de Oxigênio Bioquímico
Bz	Benznidazol
CBA	Cytometric Bead Array
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CUT	Inóculo via cutânea
DMP	Dia do máximo de parasitemia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dai	Dias após infecção
DTU	Unidades Taxonômicas Distintas
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
g	Força gravitacional
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IG	Via intragástrica
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IP	Via intraperitoneal
LIT	Triptose de Infuso de Fígado
ND	Não detectado
NR	Não realizado
OPAS/OMS	Organização Pan- Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde
OCU	Inóculo via ocular
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PPP	Período pré-patente
PP	Período patente
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TM	Tripomastigota metacíclico
TNF- $\alpha$	Fator alpha de Necrose Tumoral

TS	Tripomastigota sanguíneo
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
WHO	World Health Organization

1 INTRODUÇÃO	
1.1 A doença de Chagas.....	15
1.2 Transmissão vetorial.....	17
1.3 Transmissão por transfusão de sangue e transplante de tecidos/órgãos .....	19
1.4 Transmissão vertical .....	19
1.5 Transmissão acidental.....	20
1.6 Transmissão oral .....	20
1.7 Interação parasito x hospedeiro .....	24
2- JUSTIFICATIVA .....	28
3- OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
4- METODOLOGIA .....	30
4.1 Parasitos.....	30
4.2 Animais.....	30
4.3 Infecção e grupos experimentais .....	31
4.4 Caracterização biológica.....	32
4.4.1 Infectividade e curva de parasitemia.....	32
4.4.2 Extração de DNA e realização de PCR no sangue periférico .....	32
4.5 Eutanásia e coleta de material biológico.....	34
4.6 Avaliação do tropismo tecidual por qPCR .....	34
4.6.1 Geração dos padrões para qPCR.....	35
4.6.2 PCR em tempo real .....	35
4.7 Avaliação histopatológica.....	36
4.8 Determinação dos níveis de citocinas por “Cytometric Bead Array” (CBA) .....	37
4.9 Determinação dos níveis séricos de imunoglobulinas .....	38
4.10 Análise estatística .....	38
5- RESULTADOS .....	40
5.1 Influência do tempo de manutenção do <i>Trypanosoma cruzi</i> em cultivo acelular na sua infectividade para camundongos.....	40
5.2 Influência da via de inoculação e da origem do tripomastigota na evolução da infecção de camundongos pela cepa Colombiana de <i>T. cruzi</i> .....	41



---

5.2.2 Infectividade, parasitemia e mortalidade .....	41
5.2.3 Distribuição tecidual do parasito .....	45
5.2.4 Análises histopatológicas quantitativas e semi-quantitativas .....	55
5.2.5 Peso médio do baço e fígado .....	66
5.2.6 Quantificação de citocinas por Citometric Beads Array.....	67
5.2.7 Detecção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> no soro dos animais.....	69
6- DISCUSSÃO.....	73
7- CONCLUSÃO .....	85
8- REFERÊNCIAS .....	86

## 1 -INTRODUÇÃO

### 1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, tendo sido descoberta e descrita por Carlos Justiniano Ribeiro Chagas que, na época, era médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909). O processo da descoberta se iniciou quando Carlos Chagas chegou a Lassance, cidade situada no norte do estado de Minas Gerais, com a missão de trabalhar no controle da malária. Neste tempo, examinou o sangue de diversos animais em busca de parasitos. Assim, Chagas identificou, no sangue de um sagui, uma nova espécie de protozoário, que mais tarde recebeu o nome de *T. cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz. Esta zoonose é típica das regiões tropicais e subtropicais da América Latina, cuja ocorrência se estende até a região sudeste dos Estados Unidos da América. Além disso, devido ao aumento do processo de imigração da população de áreas endêmicas para áreas não endêmicas, têm se observado a globalização da doença de Chagas (SCHMUNIS; YADON, 2010). Estima-se que existam de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo infectadas (WHO, 2017) e este número passa a ser ainda mais preocupante quando se considera que mais de 80% das pessoas atingidas pela doença de Chagas no mundo não possuem acesso ao diagnóstico e ao tratamento de forma sistemática, elevando o impacto de morbimortalidade e o custo social da enfermidade (DIAS et al., 2016).

Clinicamente a doença de Chagas apresenta fases distintas: aguda e crônica. A fase aguda, caracterizada pela presença de altos níveis de parasitos no sangue e nos tecidos, manifesta-se de forma assintomática ou oligossintomática tendo como principais características clínicas febre, apatia, edema nos membros inferiores ou na face, hepatoesplenomegalia, infarto ganglionar generalizado e taquicardia (LOPES; CHAPADEIRO, 1997). Após a fase aguda da infecção inicia-se a fase crônica, onde a presença do parasito circulante é escassa e dificilmente detectada por métodos diretos de avaliação parasitológica convencional. Nesta fase, a maioria dos casos apresenta-se na forma indeterminada, que é assintomática e mais prevalente, no entanto pode evoluir para as formas cardíaca e/ou digestiva (COURA, 2007).

Indivíduos com forma digestiva (10-15%) (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010) apresentam alterações que resultam, principalmente, no comprometimento do sistema nervoso entérico, em particular do plexo mientérico de Auerbach e Meissner (TAFURI; BRENER,

1967). As células nervosas desse plexo sofrem fenômenos degenerativos em meio ao processo inflamatório causado pelo *T. cruzi* (ANDRADE; ANDRADE, 1966; KOEBERLE, 1961) e, como consequência, surgem incoordenações motoras, retenção de alimentos no esôfago, hipertrofia muscular e consequente dilatação muscular levando à formação dos “megas”. Por outro lado, a forma cardíaca é reconhecida como a mais grave e frequente dentre as formas crônicas sintomáticas da doença de Chagas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Desenvolve-se em cerca de 20-30% dos indivíduos e normalmente leva a anormalidades do sistema de condução e formação do estímulo cardíaco, afetando a funcionalidade do coração podendo levar o indivíduo ao óbito. A forma cardíaca é relacionada à morte súbita, devido principalmente aos aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, arritmias e fenômenos tromboembólicos (MARIN NETO; SIMÕES; SARABANDA, 1999; RASSI; RASSI; LITTLE, 2000).

A doença de Chagas era tratada como enzootia, uma vez que aparentemente afetava exclusivamente animais silvestres, transmitida por triatomíneos também silvestres. No entanto, devido às ações de antropização, os triatomíneos conseguiram se instalar em áreas domiciliares e peridomiciliares tornando esse tipo de infecção uma antropozoonose em algumas regiões endêmicas. A transmissão natural ou vetorial do *T. cruzi* ocorre através do contato de excretas contaminadas de insetos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros, com a mucosa ou pele lesionada do homem (SCHOFIELD, 1994). O *T. cruzi* também pode ser transmitido pelas vias oral, congênita, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, além de acidentes de laboratório. Até meados dos anos 50 era reconhecida como uma endemia quase totalmente rural, mais comum em pessoas com baixo poder aquisitivo, predominando a transmissão vetorial. Porém, devido ao processo de industrialização do país, a doença passou a um novo contexto epidemiológico urbano (COURA; DIAS, 2009; DIAS et al., 2016).

Durante o ciclo biológico do *T. cruzi* são observadas diferentes formas evolutivas que apresentam características morfológicas e biológicas peculiares. As formas epimastigotas replicam, por divisão binária, no intestino médio do inseto triatomíneo e na ampola retal transformam na forma não- proliferativa, os tripomastigotas metacíclicos, que são eliminados com as fezes e a urina dos triatomíneos em seguida ao repasto sanguíneo. Essas formas são altamente infectantes e penetram no hospedeiro vertebrado através de lesões na pele ou mucosas e pela via oral, invadem as células e se diferenciam em formas amastigotas que, após vários ciclos replicativos, diferenciam em formas tripomastigotas. Essas formas são liberadas

na circulação após a ruptura da célula hospedeira. As formas tripomastigotas podem infectar outras células ou infectar o inseto vetor durante o repasto sanguíneo (GIORGI e LEDERKREMER, 2011).

A espécie *T. cruzi* é heterogênea, possuindo várias subpopulações com diferentes características genéticas distribuídas entre seus hospedeiros definitivos e intermediários (ZINGALES et al., 1998). De acordo com o novo consenso para a nomenclatura intraespecífica do *T. cruzi* estabelecida em 2009 (ZINGALES et al., 2009), os isolados e cepas conhecidos do parasito podem ser distribuídos em 6 linhagens genéticas (TcI a TcVI) ou DTU – “discrete typing units”. As linhagens genéticas TcI, TcIII e TcIV são mais comuns nos ciclos de transmissão silvestres (MILES et al., 2009; YEO et al., 2005). No ciclo doméstico de transmissão, TcI predomina no norte da América do Sul, possivelmente associada a uma doença humana menos severa, enquanto Tc II, TcV e TcVI são mais comuns no Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), onde as formas cardíacas graves são mais frequentes. Na Amazônia brasileira, Venezuela, Colômbia, América do Norte e Central, o TcI é a DTU predominantemente associado a surtos agudos e doença de Chagas (MILES et al., 1981; RUÍZ-SÁNCHEZ et al., 2005). O TcIV é encontrado na Amazônia e ao sul da América do Norte, mais frequentemente isolado de primatas e, recentemente, esta DTU foi associada à surtos de doença de Chagas adquiridas por via oral na Amazônia brasileira (MONTEIRO et al., 2012).

### 1.2 Transmissão vetorial

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida heteroxeno alternado entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos), que atuam como vetores do parasito e uma grande variedade de hospedeiros mamíferos incluindo o homem (BRENER; ANDRADE, 1979). No Brasil têm-se aproximadamente 65 espécies de triatomíneos, sendo reconhecidas cinco como aquelas que têm, ou tiveram, participação mais relevante na transmissão domiciliar: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus* (GALVÃO, 2014). Além disso, esse parasito é encontrado circulando na natureza entre mais de uma centena de espécies de mamíferos distribuídos em sete diferentes ordens (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009).

Nos anos 70 a área correspondente à endemia para doença de Chagas incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios (GALVÃO, 2014). Devido a este panorama alarmante,

um levantamento epidemiológico foi realizado (Região Amazônica não participou, pois na época era considerada indene à doença de Chagas) e medidas de controle foram adotadas, mais intensamente no período de 1975 a 1983 centradas no combate dos vetores domiciliados com inseticidas (SILVEIRA; DIAS, 2011). Tal ação proporcionou a virtual eliminação da principal espécie vetora no país, o *T. infestans*, em parte da área considerada endêmica. No ano de 2006 o Brasil recebeu a Certificação da Interrupção da Transmissão da doença Chagas pelo *T. infestans* e por transfusão sanguínea, pela OPAS/OMS, como resultado da Iniciativa dos Países do Cone Sul (DIAS, 2007).

Os investimentos no controle da doença de Chagas foram reduzidos após a notória diminuição da transmissão pelas vias vetorial e transfusional, no entanto é de extrema importância que se siga exercendo a vigilância entomológica (DIAS, 2006). Dados do Ministério da Saúde, relativos à vigilância entomológica (passiva ou ativa) específica do período de 2007 a 2011, indicam o registro da captura de mais de 770 mil triatomíneos nos contextos locais de domicílios e peridomicílios no país. Considerando-se a baixa cobertura das ações de vigilância entomológica, este registro provavelmente engloba menos de 10% dos triatomíneos dentro ou próximo às residências (DIAS et al., 2016). A integração dos reservatórios no processo de vigilância de rotina deve ser considerada tendo em vista que animais domésticos não confinados também podem atuar como elo entre os ciclos de transmissão silvestre e domiciliar (ROQUE et al., 2008).

Segundo dados publicados no II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas de 2015, as espécies que apresentaram as maiores taxas de infecção natural foram: *T. vitticeps* (52,0%), *Rhodnius robustus* (33,3%) e *P. lutzii* (29,4%). Sendo que o *T. vitticeps* é encontrado com maior frequência nos estados da região Sudeste (Minas Gerais e Espírito Santo), o *R. robustus* tem sua área de maior registro, segundo os dados do Ministério da Saúde, na região Norte (Tocantins, Amazonas, Acre e Rondônia), e o *P. lutzii* na região Nordeste (Piauí, Bahia, Sergipe, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Norte, Ceará e Pernambuco). Para o período de 2007 a 2011, identificou-se ainda a persistência de focos de *T. infestans* em quatro municípios da Bahia e em doze no Rio Grande do Sul de acordo com dados publicados pelo Ministério da Saúde em 2015 (DIAS et al., 2016)

O caráter primário da tripanossomíase americana é enzoótico, o que faz com que a transmissão vetorial seja sempre possível. Além disso, a manutenção das demais formas de transmissão depende daquela que é naturalmente produzida pela veiculação do *T. cruzi* pelos vetores domiciliados ou não (GALVÃO, 2014).

### 1.3 Transmissão por transfusão de sangue e transplante de tecidos/órgãos

Durante os anos 50, a doença de Chagas transfusional foi intensificada devido ao processo de industrialização e conseqüente migração zona rural – zona urbana, tornando alta a presença de indivíduos chagásicos nos centros urbanos. Nesta época, no Brasil, a prevalência média estimada de sorologia reagente para *T. cruzi* entre candidatos à doação de sangue era em torno de 10% (DIAS, 2006).

Após a grande mobilização da sociedade científica no combate aos vetores de *T. cruzi* em meados dos anos 80, novas normas foram adotadas no sentido de minimizar as transmissões desta infecção por transfusões sanguíneas. Foi proibida a existência de doadores remunerados, foi normatizada a prática de hemoterapia e tornou-se obrigatória a seleção sorológica dos candidatos a doação. Os resultados foram melhores que o esperado, tendo sido atestado pelo virtual desaparecimento de casos agudos e pelos baixos índices de sorologia positiva em crianças (DIAS, 2006). Segundo relatório do Ministério da Saúde de janeiro a junho de 1994, a prevalência estimada entre candidatos à doação de sangue reagente ao *T. cruzi* foi 0,75%. Em 2006 esta estimativa foi de 0,21% e no ano de 2010 a Organização Mundial da Saúde estimou a prevalência em 0,18% no país (DIAS et al., 2016).

No caso de transplante de órgãos, devem ser considerados os padrões de endemicidade das áreas de origem e residência, tanto de doadores quanto de receptores, no sentido de se delinear a melhor conduta possível para cada caso em termos da triagem e do manejo de eventual infecção por *T. cruzi* (PINAZO et al., 2011).

### 1.4 Transmissão vertical

A principal via da transmissão vertical é a transplacentária e pode ocorrer em qualquer fase da infecção chagásica: aguda ou crônica, em qualquer época da gestação, sendo mais provável no último trimestre. A transmissão da mãe para o feto pode ocorrer, também, no canal do parto, pelo contato das mucosas do feto com o sangue da mãe infectada (GÜRTLER; SEGURA; COHEN, 2003).

Para avaliar a prevalência deste tipo de transmissão, foi conduzido um novo inquérito sorológico envolvendo 105 mil crianças de 0 a 5 anos, no período de 2001 a 2008 (OSTERMAYER et al., 2011) em toda a área rural do Brasil, exceto o estado do Rio de

Janeiro. A prevalência estimada foi de 0,03% crianças infectadas por *T. cruzi*. No entanto apenas 0,02% apresentavam positividade materna concomitante. Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde nos anos de 2005 e 2014, no Brasil, a doença de Chagas congênita é considerada aguda e, portanto, sua notificação é compulsória (DIAS et al., 2016).

A doença de Chagas materna pode afetar o crescimento e maturidade dos fetos infectados, o que pode levar ao aborto, nascimento prematuro e malformações fetais. Neste tipo de transmissão não há um perfil clínico definido, podendo ser assintomático (50 a 90 % dos casos) até casos muito graves (GONTIJO et al., 2009; RASSI et al., 2004).

O tratamento específico é considerado obrigatório em todos os casos de transmissão congênita, já o tratamento de gestantes não é recomendado por causa da toxicidade do fármaco utilizado. Logo, um diagnóstico precoce das crianças infectadas e controle das outras principais formas de transmissão, principalmente nas áreas endêmicas, são de fundamental importância (TORRICO et al., 2004).

### 1.5 Transmissão acidental

Este tipo de transmissão acontece com pessoas que trabalham de alguma forma com vetores *T. cruzi* ou com o próprio parasito, como por exemplo: laboratórios de triatomíneos, ações de captura do vetor, trabalhos experimentais com mamíferos infectados ou culturas, cirurgões, coleta de sangue a partir de pessoas com infecção aguda, dentre outras. Os fatores de risco passam por: desatenção, desconhecimento e falta de capacitação. Como medida de controle, cita-se a utilização de equipamentos de proteção individual adequado (luvas, máscara, óculos, mangas longas), além de um treinamento rigoroso (DIAS; AMATO NETO, 2011).

### 1.6 Transmissão oral

Após a diminuição da transmissão vetorial e por transfusão sanguínea, notadamente nos países do Cone Sul, maior atenção tem sido dada aos surtos de infecção oral (COURA, 2006). Este tipo de transmissão é considerado como mecanismo primário no ciclo silvestre da tripanossomíase americana e, segundo o Ministério da Saúde, continuará a ocorrer independente das medidas de controle que sejam tomadas (DIAS; AMATO NETO, 2011).

A transmissão oral ao homem ocorre de maneira esporádica, por meio de alimentos contaminados com o vetor infectado ou suas dejeções, com registros desde os anos 60 (DIAS; AMATO NETO, 2011). A transmissão oral pode ocorrer, também, pela ingestão de leite materno de mãe com diagnóstico de doença de Chagas aguda, em casos de coinfeção de *T. cruzi*/HIV ou em situações de sangramento por fissuras na mama (DIAS et al., 2016)

Vários autores têm demonstrado a importância, frequência e visibilidade da transmissão oral na atual cadeia epidemiológica da doença de Chagas (COURA, 2006; LAINSON; SHAW; NAIFF, 1980; SHIKANAI-YASUDA et al., 1991). No Brasil, o Ministério da Saúde contabilizou 112 surtos entre 2005 e 2013, envolvendo 35 municípios da Região Amazônica, sendo a fonte provável de infecção a ingestão de alimentos contaminados com o *T. cruzi* entre eles o açaí, bacaba, jaci, caldo-de-cana e palmito de babaçu (DIAS et al., 2016). Casos fora da região Amazônica também foram notificados e estudados, como o surto em Santa Catarina em 2005, associado à ingestão de caldo-de-cana (STEINDEL et al., 2005), mas também há surtos notificados na Bahia, Rio Grande do Sul, Paraíba e Ceará (DIAS; AMATO NETO, 2011).

Segundo Yoshida (2008), nos surtos de doença de Chagas na Amazônia, em que a via de transmissão se deu por meio de alimentos contaminados, diferenças aparentes na clínica da doença por transmissão vetorial foram observadas e os sintomas foram mais severos com morbimortalidade mais elevada, provavelmente relacionada à maior carga parasitária e ao mecanismo eficiente de infecção através da mucosa do estômago. A taxa de mortalidade é maior nas duas primeiras semanas pós-infecção (8 a 35%) e geralmente está associada à insuficiência cardíaca congestiva aguda, miocardite e meningoencefalite (PINTO et al., 2001; PRATA, 2001; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). A febre é a manifestação predominante na maioria dos casos graves e têm sido relatados em 13,3% dos registros, quase sempre relacionados à miocardite aguda e a manifestações hemorrágicas graves (DIAS et al., 2016). O ecocardiograma e eletrocardiograma de pacientes que apresentam sintomas severos da doença de Chagas aguda mostram fibrilação atrial e efusão do pericárdio, sendo estes sintomas associados a um prognóstico ruim (BENCHIMOL-BARBOSA, 2009).

O maior surto de infecção oral notificado foi atribuído à ingestão de suco de goiaba em uma escola em Caracas, o qual causou 103 infecções entre estudantes e funcionários (DE NOYA et al., 2010). Os sintomas mais frequentes foram febre, dispneia, mialgias e edema generalizado e de face. Nesse surto, 75% dos 103 indivíduos infectados foram sintomáticos,



66% tinham anormalidades de ECG, 20% foram hospitalizados e houve uma morte por miocardite aguda (MARQUES et al., 2013).

Bastos et al (2010) realizaram o acompanhamento da evolução clínica da doença de Chagas aguda em pacientes de duas cidades no Nordeste do Brasil. A transmissão oral foi determinada como a causa de ambos os micro surtos, que teve como sintomas mais frequentes febre e dispneia. Outros sintomas e sinais que indicam envolvimento miocárdico, tais como dor torácica e derrame pericárdico, foram detectados entre os indivíduos avaliados. No entanto, seis meses após o final do tratamento com benznidazol os pacientes apresentaram melhora nos sintomas clínicos bem como uma diminuição de anormalidades encontradas tanto no eco quanto no eletrocardiograma. Estes resultados reforçam que a realização precoce do diagnóstico e tratamento são essenciais para prevenir a morbidade da doença (BASTOS et al., 2010).

Estudos sobre a infecção oral em camundongos mostram uma resposta variável que pode ser relacionada, pelo menos parcialmente, com a cepa do *T. cruzi* e a origem das formas tripomastigotas utilizadas para a infecção dos animais. Na maioria dos estudos são utilizados tripomastigotas sanguíneos (TS) ou tripomastigotas metacíclicos (TM) obtidos de cultura em meio GRACE. Além disso, os diversos estudos comparam a evolução da infecção pelas vias oral e intraperitoneal (IP), não tendo sido incluída nestes estudos a infecção pelas vias conjuntival ou cutânea. Camandaroba, Pinheiro Lima e Andrade (2002) avaliaram a influência da via de inoculação (oral e IP) na evolução da infecção de camundongos pelas cepas Peruviana (Tc II) e Colombiana (Tc I) do *T. cruzi*. Neste estudo, utilizando TS para a infecção dos animais, foi demonstrada que a via de inoculação influenciou marcadamente a infecção pela cepa Peruviana. Foram observados baixos níveis de mortalidade (20%), de parasitemia e ausência de lesões teciduais nos animais inoculados pela via oral, enquanto que entre os animais inoculados pela via IP foram detectados 100% de mortalidade, níveis altos de parasitemia e intenso infiltrado inflamatório.

De forma diferente, entre os animais infectados pela cepa Colombiana, foi observada a influência da via de inoculação nos níveis parasitêmicos, mas não nas lesões teciduais (CAMANDAROBA; PINHEIRO LIMA; ANDRADE, 2002). Dias et al., (2013) mostraram menores índices de infectividade e mortalidade em camundongos infectados com TS (cepas Y- TcII e Colombiana- TcI) pela via oral em relação aos infectados pela via IP. Adicionalmente, os mesmos autores mostraram que TS e TM (de cultura), quando inoculados por via oral, induziram infecções com níveis similares de infectividade e parasitemia. De

forma diferente, outro grupo de pesquisadores não observou diferença entre o fenótipo de células T em camundongos inoculados por via oral ou IP, com TM (de cultura) das cepas Brasil ou CL (COLLINS et al., 2011).

Estudos anteriores demonstraram que o perfil da infecção de camundongos com TS da cepa Peruviana pode ser dependente da via de inoculação. Camundongos CFI infectados através de vias IP, intravenosa ou subcutânea têm maiores taxas de infecção e mortalidade do que aqueles que receberam o parasito por vias mucosas como oral, intragástrica (IG), intrarretal, genital ou conjuntival (MARSDEN, 1967). Caradonna e Pereiraperrin (2009) infectaram camundongos BALB/c e C57BL/6 com tripomastigotas da cepa Tulahuén (TcVI) de *T. cruzi* obtidos em cultura de células Vero pelas vias subcutânea e intranasal, e encontraram maior mortalidade no grupo inoculado via subcutânea. Além disso, os camundongos infectados por via intranasal desenvolveram um maior parasitismo cerebral e menor parasitemia do que os animais infectados por via subcutânea (CARADONNA; PEREIRAPERRIN, 2009). Curiosamente, quando os camundongos são infectados com a mesma cepa simulando infecção natural, seja por via oral (orofaringe) ou cutâneo (sobre uma punção), os tripomastigotas derivados de insetos são mais infectantes através da inoculação oral em relação à TS (EICKHOFF et al., 2013).

Independentemente da DTU (cepas TcI ou TcII), a infecção por gavagem com TS (IG) apresenta menor infectividade, parasitemia e mortalidade para camundongos do que a inoculação IP (DIAS et al., 2013). Nesta linha, outros pesquisadores demonstraram que camundongos infectados pela via oral (inóculo pingado na boca do animal) por tripomastigotas de cultura celular, induziram infecção com parasitemia mais elevada quando comparados com os camundongos que foram infectados pela forma IG (gavagem) (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE et al., 2015).

Contudo, nenhum dos estudos avaliou comparativamente se o padrão de parasitismo tecidual pode ser influenciado pela origem do tripomastigota e pela via de inoculação, ou seja, pelas vias cutânea, oral, IG, conjuntival e IP. Considerando, que pelo menos teoricamente, a distribuição tecidual inicial da parasitose poderia ser influenciada pela origem do tripomastigota e/ou pela via de inoculação.

### 1.7. Interação parasito x hospedeiro

A invasão do *T. cruzi* em células não-fagocíticas de mamíferos é restrita a dois estágios do ciclo de vida do parasito: formas metacíclicas que são transmitidas pelo inseto vetor e tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea oriundas de células hospedeiras infectadas (BRENER, 1973). As formas metacíclicas podem entrar em contato com o hospedeiro mamífero pelas vias oral e vetorial, enquanto as formas sanguíneas entram em contato pelas vias congênita e transfusional, por acidentes de laboratório, dentre outras formas de infecção.

O mecanismo envolvido na invasão de células não fagocíticas pelo parasito pode ocorrer de duas maneiras. A primeira estratégia, que ocorre em 20-30% dos casos, é dependente de lisossomo, que induz a sinalização de  $Ca^{2+}$  pela geração de inositol trifosfato ( $IP_3$ ), seguida pelo recrutamento e fusão do lisossomo da célula hospedeira ao local de entrada do parasito (TARDIEUX; NATHANSON; ANDREWS, 1994, RODRIGUEZ et al., 1995, RODRIGUEZ et al., 1996, WOOLSEY et al., 2003, ANDRADE; ANDREWS, 2004). O segundo caminho, que ocorre em 70-80% das invasões, é via invaginação da membrana plasmática, seguida pela fusão intracelular com o lisossomo (WOOLSEY et al., 2003, ANDRADE; ANDREWS, 2004)

A invasão das células hospedeiras por *T. cruzi* têm sido extensivamente estudada. Estes estudos têm demonstrado que a penetração do parasito nas células hospedeiras é um processo que ocorre em várias etapas envolvendo diferentes moléculas do parasito e da célula hospedeira, que em uma orquestrada série de eventos conduz a uma elevação intracelular de  $Ca^{2+}$  em ambas as células (TYLER; ENGMAN, 2001).

Para invadir uma célula hospedeira, as formas TS e TM utilizam distintos conjuntos de moléculas de superfície que interagem diferencialmente com os componentes do hospedeiro. A glicoproteína gp82 é uma molécula específica de TM que se liga à mucina gástrica (NEIRA et al. 2003), enquanto que as glicoproteínas de superfície Tc-85, específicas de TS, se ligam a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como a laminina e a fibronectina (OUAISSI et al., 1986; GIORDANO et al., 1994; YOSHIDA, 2006).

A gp82 é uma molécula específica do estágio metacíclico do *T. cruzi*, sendo altamente conservada nas distintas linhagens do parasito (NEIRA et al., 2003). Esta molécula se liga à mucina gástrica, que é o principal componente da camada de muco que protege a mucosa gástrica. Além desta função ela induz uma cascata de sinalização que resulta na ruptura do

citoesqueleto e exocitose de lisossomos da célula hospedeira, eventos esses que facilitam a internalização do parasito (CORTEZ et al., 2014).

Outras glicoproteínas são importantes na interação de TM com a célula hospedeira. De acordo com Ruiz et al (1998), a expressão das glicoproteínas gp35/50 e gp90 estariam relacionadas com a infectividade das formas TM, sendo que estas moléculas seriam pobremente expressas nos parasitos altamente infectivos, o contrário sendo observado naqueles TM que são pouco infectivos (RUIZ et al. 1998). Nesta linha, Yoshida (2006), discute a existência de dois grupos distintos de parasitos que expressariam diferentemente glicoproteínas de superfície, sendo esta expressão relacionada á sua capacidade de invasão celular.

Da mesma forma, diversos grupos de moléculas estão envolvidos na invasão da célula hospedeira pelas formas TS. Dentro desse grupo estão as glicoproteínas de superfície Tc85 (GIORDANO et al. 1994, MAGDESIAN et al. 2001), grandes grupos de enzimas como cruzipaina e trans-sialidase (SCHENKMAN et al. 1991b) e uma oligopeptidase B (BURLEIGH et al. 1997, GRELLIER et al. 2001).

A importância das proteínas da família Tc85 na invasão celular foi demonstrada pela inibição de 50 a 90% da interiorização dos parasitos tratados com anticorpo monoclonal anti-Tc-85, denominado H1A10 (ABUIN et al., 1989). As proteínas dessa família são capazes de se ligar a diferentes moléculas receptoras presentes na superfície celular do hospedeiro vertebrado, como a citoqueratina 18 (MAGDESIAN et al., 2001). Ou, ainda, componentes que pertencem a matriz extracelular como fibronectina (OUASSI; CORNETTE; CAPRON, 1986) e laminina (GIORDANO et al., 1999), uma vez que os membros dessa família possuem glicoproteínas muldiadesivas.

As trans-sialidases são enzimas que catalisam a transferência de ácido siálico de glicoconjugados do hospedeiro vertebrado a proteínas, ancoradas por glicosilfosfatidilinositol, à superfície do *T.cruzi* (ACOSTA; SCHENKMAN; SCHENKMAN, 1994). A família das trans-sialidases compreende pelo menos 140 membros, que podem ser classificados em três grupos de acordo com sua estrutura e função (FRASCH, 2000). A participação da trans-sialidase na invasão celular foi demonstrada em experimentos que utilizaram tripomastigotas que expressavam ou não trans-sialidase. Neste experimento, foi observado que aqueles parasitos que expressavam a enzima foram altamente infectivos, enquanto os que não expressavam não foram eficientes em infectar células não fagocíticas (PEREIRA et al., 1996).

A cruzipaína é uma cisteína protease que é secretada através da bolsa flagelar do *T. cruzi* e tem sido relatada sua função de clivar o cininogênio (substrato presente no hospedeiro vertebrado) para gerar cininas, que se ligam ao receptor de bradicinina para estimular a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por inositol trifosfato (MURTA et al., 1990; SCHARFSTEIN et al., 2000). Nesta linha, Aparicio et al. (2004) relacionaram a baixa capacidade de invasão celular da cepa G com a ausência de ativação da via de internalização mediada pela cruzipaína.

A oligopeptidase B, uma serina protease citosólica de 80 KDa, é secretada por tripomastigotas de *T. cruzi*. Sua ação parece estar indiretamente ligada à indução de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a invasão celular (BURLEIGH et al. 1997, GRELLIER et al. 2001). Sua ação foi comprovada quando pesquisadores utilizaram mutantes para essa protease e observaram que os mesmos são deficientes na mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  e no estabelecimento da infecção *in vitro* e *in vivo* (CALER et al., 1998).

Outra característica interessante entre as formas TS e TM está relacionada aos diferentes perfis de citocinas induzidas *in vitro* e *in vivo*. Foi observado *in vitro* que enquanto as formas TS apresentam em suas membranas moléculas que iniciam uma robusta resposta pró-inflamatória com indução de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO por macrófagos (CAMARGO et al., 1997a; CAMARGO et al., 1997b; ALMEIDA et al., 2000), as moléculas das formas TM atuam suprimindo a ativação de macrófagos e células dendríticas, logo inibindo produção de TNF- $\alpha$  e IL-12 (DE DIEGO et al., 1997). Vieira et al. (2012) observaram que na infecção de camundongos por TM e TS da cepa Be-78 os animais inoculados com TS apresentaram alta parasitemia, um exacerbado processo inflamatório no coração e altos níveis de IL-10 ao final da fase aguda, indicando que este grupo, provavelmente, não conseguiu apresentar uma resposta imune efetiva ao início da infecção. Já os animais infectados com TM apresentaram uma resposta imune caracterizada pela presença de eosinófilos logo ao início da infecção levando a um atraso no pico de parasitemia, diminuição da inflamação cardíaca ao final da fase aguda e uma resposta imunorregulatória no baço.

De forma geral tem sido demonstrada uma marcante influência da forma tripomastigota e da via de inoculação na evolução da infecção pelo *T. cruzi*. De acordo com diferentes autores, nos surtos de infecção oral são detectados sintomas mais severos e com maior morbimortalidade em relação às infecções adquiridas pela via vetorial. Estas observações mostram a importância de estudos designados para avaliar a influência das vias de inoculação e da origem da forma tripomastigota (TS ou TM) na evolução da fase aguda da

infecção de camundongos por *T. cruzi*, com o objetivo de esclarecer os aspectos da infecção humana relacionados a estas variáveis.

## 2- JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos tem sido relatado aumento das notificações de surtos orais de infecção por *T. cruzi*, especialmente na Região Amazônica, bem como do número de casos por transmissão sanguínea em países não endêmicos. De forma interessante sintomas mais severos, com morbimortalidade mais elevada, são observados em casos de infecção pela via oral, enquanto uma fase aguda assintomática ou oligossintomática é predominante nas infecções pela via vetorial. Neste contexto, estudos designados para avaliar a influência da via de inoculação do *T. cruzi* na evolução da infecção do hospedeiro vertebrado são de grande importância para o entendimento dos mecanismos associados às diferentes manifestações clínicas observadas em indivíduos infectados pelas vias oral, conjuntival ou cutânea.

Além da via de inoculação tem sido relatado, em diferentes estudos, a importância da origem do tripomastigota na infectividade e na evolução da infecção de camundongos. Estas diferenças poderiam ser explicadas, pelo menos em parte, pelas diferentes glicoproteínas presentes nas membranas de TS e TM, implicando em diferentes mecanismos de interação com as células hospedeiras. Desta forma a infecção por TM simularia aquela causada por vetores, já a infecção por TS seria similar a infecção pela via transfusional, via congênita, além de ser a forma evolutiva normalmente utilizada em infecções experimentais.

Nesta linha, o presente estudo foi designado com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre a influência da via de inoculação (intraperitoneal, intragástrica, oral, cutânea e ocular) e da origem do tripomastigota na infectividade, virulência e patogenicidade da cepa Colombiana de *T. cruzi* para camundongos.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da via de inoculação (oral, IG, cutânea, ocular e IP) e da origem dos tripomastigotas (metacíclicos ou sanguíneos) na evolução da infecção de camundongos infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a influência da forma de manutenção in vitro da cepa Colombiana de *T. cruzi* em sua infectividade e virulência para camundongos;
- Avaliar a influência da via de inoculação e da origem do tripomastigota nos seguintes parâmetros:
  - i: comportamento biológico da cepa Colombiana do *T. cruzi* pela infectividade, curva de parasitemia, mortalidade e distribuição tecidual;
  - ii: intensidade da inflamação no coração, baço, fígado, estômago, esôfago, jejuno, intestino grosso, cérebro, bochecha, língua e musculo esquelético dos animais infectados,
  - iii: peso do baço e fígado;
  - iiii: produção sérica de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e regulatória IL-10 e da resposta imune humoral pela dosagem sérica de IgM, IgG, IgG2a e IgG2b.



## 4- METODOLOGIA

### 4.1 Parasitos

Foram utilizadas formas tripomastigotas sanguíneas e tripomastigotas metacíclicas da cepa Colombiana do *T. cruzi*. Esta cepa pertencente à DTU I (TcI) (ZINGALES et al., 2009) foi isolada de um paciente da Colômbia (FEDERICI; ABELMANN; NEVA, 1964) e considerada resistente ao tratamento com benznidazol no modelo murino (FILARDI; BRENER, 1987; VELOSO et al., 2001) e canino (GUEDES et al., 2002).

A manutenção *in vivo* dos tripomastigotas foi realizada quinzenalmente, em camundongos Swiss mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto. Para obtenção das formas metacíclicas, o sangue com as formas tripomastigotas da cepa Colombiana foi incubado em meio de cultura "Liver Infusion Tryptose" (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (do inglês "Biochemical Oxygen Demand" - B.O.D.) a temperatura de 28° C, a fim de se obter as formas epimastigotas. A partir do primeiro repique, novos repiques foram realizados em meio LIT até se obter uma cultura com grande densidade de parasitos e livre de resíduos de sangue. Uma vez obtida uma cultura em fase exponencial de epimastigotas, 5 mL desta cultura foi adicionada em uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo 15 mL de meio Grace (Grace's Insect Medium, Sigma) a 28° C para obtenção das formas metacíclicas. Neste meio, contagens diárias dos parasitos foram realizadas na câmara de Neubauer e a percentagem de formas metacíclicas era avaliada em microscópio óptico. No mínimo 200 parasitos foram contados em cada lâmina e no 8<sup>o</sup> dia foi obtido uma taxa de 30% de metaciclogênese em uma concentração de  $1,75 \times 10^7$  tripomastigotas por mL.

### 4.2 Animais

Foram utilizados camundongas BALB/c de 7 a 9 semanas de idade com média de peso de 25 g, mantidos no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, os animais foram mantidos em ciclo claro e escuro 12/12 horas, com acesso livre a água e ração. Todos os experimentos e protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), e também foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFOP (número 2014/24).

#### 4.3 Infecção e grupos experimentais

Os animais (n=80) foram inoculados com  $1 \times 10^6$  formas TS ou TM da cepa Colombiana do *T. cruzi* de acordo com os grupos experimentais descritos abaixo. Em todos os grupos experimentais a metade dos animais foi eutanasiada aos 15 dias e a outra metade aos 30 dias de infecção.

Grupo I (n=5): Animais não infectados controle.

Grupo II (n=10): Animais infectados com formas TS por via intraperitoneal.

Grupo III (n=9): Animais infectados com formas TS por via intragástrica. Nesta forma de infecção foi utilizada uma agulha de gavagem para inocular os parasitos diretamente no estômago dos animais. A concentração de  $1 \times 10^6$  foi estabelecida em 120  $\mu\text{L}$  de sangue e posteriormente diluída em 780  $\mu\text{L}$  de PBS (pH: 7,2) para que o volume final do inóculo fosse 1 mL (DIAS et al., 2013).

Grupo IV (n=10): Animais infectados com TS da cepa Colombiana pela via oral. Nesta via de infecção, o volume do inóculo foi acertado para 120  $\mu\text{L}$  (com PBS pH 7,2) e então pingado, gota por gota (utilizando pipeta e ponteira de 200  $\mu\text{L}$ ), lentamente na boca do camundongo (BARRETO-DE- ALBUQUERQUE et al., 2015).

Grupo V (n=10): Animais infectados com formas TM pela via intraperitoneal.

Grupo VI (n=9): Animais infectados com formas TM pela via intragástrica. A inoculação foi estabelecida no grupo III. A concentração de  $1 \times 10^6$  foi estabelecida em 58  $\mu\text{L}$  de cultura e posteriormente diluída em 942  $\mu\text{L}$  de GRACE.

Grupo VII (n=9): Animais infectados com formas TM da cepa Colombiana pela via oral. A inoculação foi estabelecida como no grupo IV. A concentração de  $1 \times 10^6$  foi estabelecida em 58  $\mu\text{L}$  de cultura.

Grupo VIII (n=10): Animais infectados com formas TM pela via cutânea. Para esta inoculação os animais foram anestesiados com 25  $\mu\text{L}$  de solução de ketamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Após completa sedação dos animais, foram feitas 25 escarificações com agulha na cauda do animal, sendo os parasitos ( $1 \times 10^6$  em 200  $\mu\text{L}$ ) colocados em contato com a área escarificada por 40 a 50 minutos.

Grupo IX (n=8): Animais infectados com formas TM pela via ocular. Os animais foram anestesiados como no grupo VIII. Após completa sedação,  $1 \times 10^6$  parasitos em 58  $\mu\text{L}$  de cultura foram pingados no olho de cada animal.

#### 4.4 Caracterização biológica

Para avaliar a influência da via de inoculação e da origem do tripomastigota na evolução da infecção de camundongos pela cepa Colombiana do *T. cruzi* os parâmetros descritos abaixo foram analisados.

##### 4.4.1 Infectividade e curva de parasitemia

Para avaliar a infectividade e curva de parasitemia foi realizada a coleta de 5 $\mu\text{L}$  de sangue da veia caudal de cada camundongo e a quantificação foi feita pela técnica descrita por Brener (1962). Os níveis de parasitemia foram avaliados a partir do 2<sup>o</sup> dia de infecção em todos os grupos infectados até o 30<sup>o</sup> dia pós-infecção.

##### 4.4.2 Extração de DNA e realização de PCR no sangue periférico

Nos animais com exame de sangue a fresco negativos até o 13<sup>o</sup> de infecção, foram coletados 200  $\mu\text{L}$  de sangue pelo plexo venoso retro-orbital para a realização da qPCR. Para a coleta de sangue foram adicionados 35  $\mu\text{L}$  de solução de citrato de sódio a concentração de 129 mM, sendo a extração do DNA realizada no mesmo dia da coleta. Para a extração do DNA genômico foram transferidos os 200  $\mu\text{L}$  de sangue coletado de cada animal para microtubos de 1,5 mL contendo 600  $\mu\text{L}$  de Solução de Lise Celular (Wizard® Genomic). Este conteúdo foi homogeneizado por lenta inversão (seis vezes) e mantido a temperatura ambiente por 10 minutos. Os microtubos foram centrifugados por 40 segundos a 14.000 g e o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta, restando apenas 10-20  $\mu\text{L}$  de líquido residual, os quais foram levados ao vórtex por 30 segundos. Posteriormente foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução de lise nuclear (Wizard® Genomic), os quais foram incubados por 60 minutos em banho-maria a 37<sup>o</sup> C. Os microtubos foram retirados do banho-maria, e após 10 minutos, quando atingiram a temperatura ambiente, foram adicionados 67  $\mu\text{L}$  da solução de precipitação proteica (Wizard® Genomic) aos homogeneizados em vórtex por 30 segundos e, posteriormente, centrifugados por 4 minutos a 14.000 g. O sobrenadante de cada

amostra contendo o DNA foi transferido para novos microtubos de 0,6 mL, contendo 200 µL de isopropanol. Os microtubos foram invertidos cerca de 10 vezes e agitados para que houvesse a precipitação do DNA e centrifugados por 90 segundos a 14.000 g. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µL de etanol 70% seguido de centrifugação por 90 segundos a 14.000 g. Após o descarte do sobrenadante, o microtubo foi invertido sobre papel absorvente para secagem por cerca de 30 minutos, sendo o DNA reidratado com 67 µL da solução de reidratação (Wizard® Genomic) e incubado a 4° C por 48 horas.

Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR continha 2 µL de DNA genômico (50 ng), 0,35 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para a repetição de 195 pares de bases (pb) do DNA de *T. cruzi*, TCZ-F 5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3', onde M = A ou C, e TCZ-R 5'-CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', como descrito por Cummings e Tarleton (2003), 5 µL de Sybr®Green PCR Mastermix, e água Milli-Q para um volume final de reação de 10 µL. Separadamente, para cada amostra era também realizada uma reação em duplicata para dosar o TNF- $\alpha$ , utilizado como controle endógeno normalizador contendo 2 µL de DNA genômico (50 ng), 0,50 µM de oligonucleotídeos iniciadores TNF-5241 5'-TCCCT CTCATCAGTTCTATGGCCA-3' e TNF-5411 5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTA GACCCC-3' (CUMMINGS;TARLETON, 2003), o qual amplifica um produto de 170 pb, 5 µL de "Sybr® Green PCR Mastermix", e água Milli-Q para um volume final de reação de 10 µL. As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™), centrifugadas por 2 minutos a 200 x g e levadas ao termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). O programa de termociclagem consistia de aquecimento a 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de 94° C por 15 segundos e 64,3° C por 1 minuto, com aquisição da fluorescência a 64,3° C. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de melting com desnaturação inicial a 95° C por 15 segundos, resfriamento a 60° C por 1 minuto e aumento gradual de temperatura de 0,3°C/s até 95°C. Cada placa continha um controle negativo da extração (proveniente de camundongo normal), em duplicata, para sangue, e um controle negativo da PCR, em duplicata, com água no lugar de DNA, para a reação com oligonucleotídeos iniciadores de *T. cruzi* e do TNF- $\alpha$  (CUMMINGS; TARLETON, 2003).

#### 4.5 Eutanásia e coleta de material biológico

Os animais de todos os grupos foram eutanasiados aos 15 ou 30 dias pós infecção. Na necropsia foram coletados: I- coração, que foi separado em 2 partes, a parte direita para a realização da qPCR, a qual foi mantida no freezer a - 80° C e a parte esquerda para histopatologia, que foi colocada em formol tamponado; II- esôfago, apenas para histopatologia, que foi colocado em formol 10% tamponado; III- cérebro, bochecha, língua, músculo esquelético da pata traseira esquerda, estômago, jejuno, cólon, baço e lobo maior do fígado que foram separados em 2 partes, uma parte para histopatologia, que foi colocada em formol tamponado e outra para qPCR, a qual foi armazenada no freezer a - 80° C; IV- Foram coletados em média 500 µL de sangue de cada camundongo pelo plexo venoso retro-orbital. O material foi centrifugado a 14.000 rpm a 4 °C por 10 minutos para obtenção do soro e foi armazenado a - 80° C até o momento da utilização para dosagens de citocinas e imunoglobulinas.

#### 4.6 Avaliação da distribuição tecidual do *T. cruzi* por qPCR

Para a extração de DNA de cada tecido a ser processado (cerca de 20 mg), foram adicionados 120 µL de solução de EDTA 0,5 M (pH 8.0) à 500 µL da solução de lise nucléica em um tubo cônico de 15 mL, seguido de resfriamento em gelo. Ao turvar-se, 600 µL da mistura e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen<sup>TM</sup>) foram adicionados sobre cada fragmento de tecido, em um microtubo de 1,5 mL. Estes microtubos foram incubados em banho seco por 18 horas a 55° C, sendo os tecidos vortexados após o período de incubação, até completa digestão. Posteriormente foram acrescentados 3 µL de *Rnase solution* seguido de incubação a 37° C por 15 minutos em banho seco. Em temperatura ambiente, 200 µL de solução de precipitação proteica foram adicionados a cada amostra a qual foi levada ao vórtex por 20 segundos e logo em seguida resfriada em gelo por 5 minutos. Após este procedimento, foi realizada a centrifugação das amostras por 4 minutos a 13.000 g e o sobrenadante, contendo o DNA, era cuidadosamente transferido para outro microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol. A solução era gentilmente misturada por inversão até a precipitação do DNA e centrifugada por 1 minuto a 13.000 g. Descartava-se por inversão o sobrenadante e adicionavam-se 600 µL de etanol 70%, sendo o microtubo invertido várias vezes para lavar o DNA, e centrifugado por 1 minuto a 13.000 g. Novamente descartava-se o sobrenadante e o

microtubo era invertido sobre papel absorvente para secagem por 45 minutos. Após a secagem, adicionavam-se 100 µL de solução de reidratação e os microtubos eram incubados a 4° C *overnight* para a completa reidratação do DNA.

#### 4.6.1 Geração dos padrões para a qPCR quantitativa

Para cada tecido de camundongo a ser analisado foram gerados padrões específicos para a quantificação do *T. cruzi*. Tal medida foi tomada devido à possibilidade de interferências nas eficiências de amplificação e nas faixas de linearidade de quantificação do parasito, uma vez que poderia haver fatores inibitórios da PCR em concentrações variadas em cada tecido. Assim, os DNA provenientes de cultura com quantidade conhecida de epimastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi* foram misturadas em DNA dos diferentes tecidos de camundongos. Desta forma foram gerados padrões específicos para cada órgão com concentração inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/25 µg de DNA. Tais padrões foram submetidos a diluições seriadas nos respectivos DNA dos tecidos à 25 µg/ mL para determinação da faixa linear onde o DNA do parasito podia ser quantificado em um gráfico do tipo XY (DNA *versus* ciclos de amplificação), em reações multiplex de PCR em tempo real pelo sistema TaqMan, incluindo o gene que codifica o TNF- $\alpha$ , presente em uma única cópia no genoma de camundongos, como controle interno de extração de DNA e amplificação da PCR. As curvas padrão para cada tecido foram geradas utilizando-se 5 pontos de diluição escolhidos a partir da faixa de linearidade de cada tecido.

#### 4.6.2 qPCR

Para cada amostra, analisada em duplicata, a reação de PCR multiplex continha 2 µL de DNA genômico à 25 µg/mL, 0,35 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o DNA satélite do *T. cruzi*, (CzFw 5'-CCACCATTCATAATTGGAAACAAA-3' e CzRv 5'-CTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3' o qual amplifica um produto de 76 pb) e do TNF-alfa murino (TNF-F 5'-GCCCAGACCCTCACACTCA-3' e TNF-R 5'-AACTGCCCTTCCTCCATCTTAAA-3', o qual amplifica um produto de 69 pb), 0,15 µM de sonda oligonucleotídica para o *T. cruzi* (5' FAM-ACCACAACGTGTGATGC-3' MGB-NFQ) e para o TNF- $\alpha$  (5' VIC-TAAGTGTTCCACACCTC-3' MGB-NFQ), 5 µL de 2x TaqMan®

Universal Master Mix II e 1,3 µL de BSA à 0,25 mg/mL, perfazendo um volume total de 10 µL/reação.

As reações foram distribuídas em placas de 96 poços (Fast 96-Well Reaction Plate, 0,1 mL, MicroAmp™), centrifugadas por 2 minutos a 200 g e levadas ao termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems). O programa de termociclagem consistiu de aquecimento a 95° C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Cada placa continha um controle negativo da extração (proveniente de camundongo normal), em duplicata, e um controle negativo da PCR, em duplicata, com água no lugar de DNA. As eficiências de amplificação foram determinadas automaticamente pelo software 7500 v2.3 através da fórmula: Eficiência (E) =  $10(-1/\text{slope})$ , onde slope corresponde à inclinação da curva padrão (STORDEUR et al., 2002).

#### 4.7 Avaliação histopatológica

Os fragmentos de tecidos armazenados em formol tamponado foram primeiramente desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico por 30 minutos em cada concentração (70%, 80%, 90% e 100%). Em seguida, esses tecidos foram diafanizados em dois banhos de xilol de 10 minutos cada, sendo a última etapa de fixação, a inclusão em parafina, também em dois banhos de 10 minutos cada, para assegurar a completa remoção do xilol.

Para análise e quantificação do infiltrado inflamatório, esses fragmentos foram corados pela Hematoxilina & Eosina. Cortes seriados desses tecidos foram desparafinizados em imersões em xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em água corrente e em tampão fosfato (PBS). Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado e corados pela Eosina. Após o último processo de lavagem em água corrente, foram levados até a estufa para secagem. Posteriormente colocados em banho de xilol e, então, montadas as lâminas com auxílio de Entellan.

Para análise quantitativa dos núcleos celulares no tecido hepático foram analisadas 30 imagens (campos) aleatórias cada uma com área total de 35.493,7 µm<sup>2</sup>. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e foram digitalizadas através de microcâmera Leica MC170HD e processadas por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin v4.10. A presença de processo inflamatório foi determinada pela média do número de núcleos celulares

presentes nas imagens dos animais controles não infectados. Assim, os camundongos infectados com o *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação hepática.

Para a análise quantitativa dos núcleos celulares presentes no tecido muscular cardíaco foram analisadas 20 imagens (campos) aleatórias cada uma com área 76.820,3  $\mu\text{m}^2$  através do microscópio óptico Leica DM5000B. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e foram digitalizadas através de microcâmera Leica DFC 300FX e processadas por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin v4.10. A miocardite foi determinada pela média do número de núcleos celulares presentes nas imagens dos animais controles não infectados, assim, os camundongos infectados com o *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca.

Para análise das alterações presentes no baço foram determinadas pelas áreas médias dos folículos linfóides da área total do órgão. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 5x e foram digitalizadas através de microcâmera Leica DFC 300FX e processadas por meio do programa analisador de imagens imageJ.

Para análise semi-quantitativa da inflamação dos outros tecidos, foram utilizados os seguintes parâmetros, de acordo com a intensidade do processo inflamatório:

(-) Aspecto histológico normal; (+) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso discreto; (++) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso moderado; (+++) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso intenso.

#### 4.8 Determinação dos níveis de citocinas por “Cytometric Bead Array” (CBA)

Os soros coletados no 15º e no 30º dia de infecção dos animais, mantidos criopreservados a -80°C, foram utilizados para determinação dos níveis séricos das seguintes citocinas, por CBA: IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 (Cytometric Bead Array -Mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit– BD). As reações foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O kit de citocina BD CBA Mouse Th1 / Th2 / Th17 usa microesferas (beads) para detectar simultaneamente múltiplas citocinas em uma pequena amostra de soro. Três populações de beads com distintas intensidades de fluorescência foram revestidas com anticorpos de captura específicos para proteínas IFN- $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  e IL-10. Essas três populações de beads são misturadas em um mesmo tubo com a amostra alvo, e são lidas em um único canal em citômetro de fluxo (FACScalibur®, BD Biosciences, EUA). Os resultados foram



obtidos em pg/mL, analisados no software FCAP array (BD Biosciences) e os limites de detecção foram de 20 pg/mL a 5.000 pg/mL.

#### 4.9 Determinação dos níveis séricos de imunoglobulinas

Os soros coletados durante as necropsias realizadas 15 e 30 dias após a infecção e armazenados a - 80° C foram utilizados para detecção das imunoglobulinas anti- *T. cruzi* das classes IgM e IgG e das subclasses IgG2a e IgG2b. Foram utilizados antígenos da forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*, mantidas em cultura acelular em meio LIT. Como conjugado foram utilizados anti-imunoglobulinas de camundongo da classe IgM e IgG (e suas subclasses) marcadas com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery – USA).

O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços de alta afinidade. Cada poço foi tratado com o antígeno diluído na solução tampão carbonato na concentração de 3 µg de proteína/mL. As placas foram incubadas por 18 horas a 4° C e após esse tempo foram bloqueadas com 100 µL de PBS contendo soro fetal bovino a 5% e incubadas a 37°C por uma hora. Em seguida foram adicionados 100 µL de cada soro diluído na proporção 1:80 em PBS e tween 20 a 0,05% (PBS-T). Após incubação por 45 minutos as placas foram lavadas e 100 µL de cada conjugado foi adicionado. Os conjugados foram diluídos em PBS-T conforme a diluição previamente estabelecida. As placas foram incubadas por 45 minutos. Após quatro lavagens foram adicionados 100 µL de tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0, contendo 0,03% de ortofenilidiamino (Sigma-Aldrich) e 0,12% de peróxido de hidrogênio como substrato. As microplacas foram incubadas por 10 minutos no escuro e a reação foi interrompida com a adição de 25 µL de ácido sulfúrico 4 N. Em cada placa foram adicionados 10 soros de animais não infectados e de 2 animais infectados. As leituras das reações foram feitas em leitor de ELISA (Biochrom Anthos 2010) utilizando-se filtro de 492 nm e os resultados expressos em valores de absorbância.

#### 4.10 Análise estatística

A parasitemia foi expressa como média ± desvio padrão. Os níveis de parasitemia foram analisados pelo cálculo da área sob a curva de parasitemia. A área sob a curva de parasitemia foi analisada pela análise de variância seguido do teste de Mann-Whitney pelo software GraphPad Prism. A análise do parasitismo tecidual, níveis séricos de citocinas e

imunoglobulinas e histopatologia foram realizadas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. Os dados foram considerados significativos quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5- RESULTADOS

### 5.1 Influência do tempo de manutenção do *T. cruzi* em cultivo acelular na sua infectividade para camundongos

Na primeira etapa deste estudo foi avaliada a influência do tempo de manutenção do parasito em meio de cultura acelular na infectividade e na virulência de TM da cepa Colombiana para camundongos. Para a obtenção dos TM os parasitos previamente mantidos por longo período (> de 1 ano) em meio LIT ou recém-isolados de camundongos (por hemocultura) foram incubados em meio Grace. Os resultados da Tabela 1 mostram que a manutenção do parasito por um longo período em meio LIT não alterou significativamente a infectividade dos TM da cepa Colombiana inoculados pelas vias IP, oral ou IG. O parasito e/ou o seu DNA foram detectados em 60 a 100% dos animais inoculados com TM, obtidos de cultura mantidas por longo período, pelas diferentes vias de inoculação e em 100% dos animais infectados com TM oriundos de parasitos recém-isolados de camundongos. De forma diferente, a virulência do TM foi influenciada pelo tempo de manutenção em meio de cultura. Nos animais inoculados com TM obtidos de culturas recém-isoladas de camundongos o parasito foi detectado por exame de sangue a fresco em 100% dos animais inoculados pelas vias IP, Oral e IG, com níveis de parasitemia de 20.000 a 35.000 parasitos/0,1 mL de sangue. De forma diferente, entre os animais inoculados com TM, obtidos de culturas mantidas por longo período, o parasito foi detectado pelo exame de sangue a fresco apenas em 10% (1 de 10) dos animais inoculados por via oral e em 30% (3 de 10) daqueles que receberam o parasito via IG. Adicionalmente, nestes animais, o nível de parasitemia variou entre 2.000 a 3.333 parasitos/0,1mL de sangue.

De forma geral estes resultados mostraram que o tempo de manutenção do parasito em meio de cultura pode influenciar a evolução da infecção de camundongos de acordo com os parâmetros analisados. Considerando estes resultados, em todos os experimentos realizados a seguir foram utilizados TM obtidos de culturas recém-isoladas de camundongos infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*.

Tabela 1: Avaliação da influência do tempo de manutenção do parasito em meio de cultura acelular e a infectividade e virulência de tripomastigotas metacíclicos da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* em camundongos BALB/c.

Parasitos	Via de Inoculação	+ ESF	PPP <sup>1</sup> (dias)	Máximo de parasitemia <sup>2</sup>	+PCR <sup>3</sup>
Longo tempo de manutenção <sup>4</sup>	Intraperitoneal	0/10 (0%)	-	ND	10/10 (100%)
	Oral	1/10 (10%)	11,00 ± 0,00	2.000	6/10 (60%)
	Intragástrica	3/10 (30%)	10,00 ± 1,00	3.333 ± 1154	9/10 (90%)
Recém isolado de camundongo <sup>5</sup>	Intraperitoneal	6/6 (100%)	9,40 ± 1,51	20.000 ± 25.000	6/6 (100%)
	Oral	10/10 (100%)	7,50 ± 2,38	35.000 ± 22.500	10/10 (100%)
	Intragástrica	10/10 (100%)	8,25 ± 0,50	21.600 ± 7.100	10/10 (100%)

ESF: Exame de sangue a fresco. PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

1: Período pré-patente

2: Parasitos por 0,1 mL de sangue

3: + PCR (sangue e/ou tecido cardíaco)

4: Mantidos por passagens sucessivas em meio LIT

5: Isolados por hemocultura

## 5.2 Influência da via de inoculação e da origem do tripomastigota na evolução da infecção de camundongos pela cepa Colombiana de *T. cruzi*

Neste estudo foi avaliada a influência da via de inoculação (IP, IG, oral) e da origem do tripomastigota (sanguíneo ou metacíclico) na infecção de camundongos BALB/c pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (TcI). Adicionalmente, para mimetizar a infecção vetorial, os TM foram inoculados pelas vias cutânea e ocular. Os seguintes parâmetros foram avaliados: infectividade, virulência, patogenicidade, inflamação tecidual, peso do baço e fígado e aspectos da resposta imune humoral e celular.

### 5.2.2 Infectividade, parasitemia e mortalidade

O índice de infecção variou de 60% a 100% entre os animais inoculados com  $1 \times 10^6$  tripomastigotas metacíclicos (TM) ou tripomastigotas sanguíneos (TS) da cepa Colombiana pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral, cutânea e ocular (Tabela 2). Nos

animais infectados com TS foram observados 100% de infecção entre os animais inoculados pelas vias IP e oral e 77,7% naqueles inoculados via IG. De forma similar, foi detectado 100% de infecção quando os animais foram inoculados com TM pelas vias IP, IG e oral. Taxas de infecção menores foram detectadas entre os animais que receberam os TM pelas vias ocular (88,8%) e cutânea (70%). É importante ressaltar que quando os animais foram inoculados com TM pela via cutânea a infecção foi confirmada apenas pela detecção do DNA do parasito pela reação de qPCR realizada em amostras de sangue periférico, sendo o exame de sangue a fresco persistentemente negativo (Tabela 2).

O período pré-patente (PPP) também foi influenciado pela origem do tripomastigota e pela via de inoculação. Entre os animais inoculados com TS foi detectado um período pré-patente de 2 dias nos animais inoculados pela via IP e de 11,25 e 11,2 dias entre os animais que receberam o parasito pelas vias IG e oral, respectivamente. Entre os animais inoculados com TM o período pré-patente foi semelhante para as diferentes vias de inoculação, sendo de 9,4 dias (via IP), 8,8 dias (via IG) e 9,6 dias (via oral). Os animais inoculados com TM pela via ocular apresentaram um período pré-patente maior (17,4 dias) (tabela 2).

O período de patência da parasitemia (PP) foi maior entre os animais inoculados com TS (16,75 a 22 dias) em relação aos inoculados com TM (2,2 a 10,8 dias). Nos animais inoculados com TS o parasito foi detectado durante 22 dias no sangue periférico dos animais inoculados pela via IP, e por 17,75 e 16,75 dias naqueles inoculados pelas vias IG e oral, respectivamente. Quando os camundongos BALB/c foram inoculados com TM, pelas mesmas vias de inoculação, o período de patência da parasitemia foi menor, sendo o parasito detectado por um período de 9,4 dias nos animais inoculados pela via IP, 10,8 dias nos inoculados pela via IG e 10,2 dias naqueles que receberam o parasito pela via oral. O menor período de patência da parasitemia foi detectado entre os animais inoculados com TM pela via ocular, que foi de 2 dias.

Tabela 2: Média e desvio padrão de parâmetros parasitológicos em camundongos infectados pelas vias intraperitoneal, intragástrica, oral, cutânea e ocular por tripomastigotas sanguíneos ou metacíclicos da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*.

	Via de inoculação	Infeção (%) <sup>*</sup>	PPP <sup>1</sup> (dias)	PP <sup>2</sup> (dias)	Mortalidade (%)
Tripomastigota sanguíneo	Intraperitoneal	9/9 (100)	2	22	9/9 (100)
	Intragástrica	7/9 (77,7)	11,25 ± 2,06	17,75 ± 1,75	0/7 (0)
	Oral	10/10 (100)	11,2 ± 1,64	16,75 ± 2,87	1/10 (10)
Tripomastigota metacíclico	Intraperitoneal	10/10 (100)	9,4 ± 1,94	9,4 ± 6,32	0/10 (0)
	Intragástrica	9/9 (100)	8,8 ± 0,44	10,8 ± 2,72	0/9 (0)
	Oral	9/9 (100)	9,6 ± 3,44	10,2 ± 6,96	0/9 (0)
	Cutânea	7/10 (70)	ND	ND	0/6 (0)
	Ocular	8/9 (88,8)	17,4 ± 1,8	2,2 ± 1,44	0/8 (0)

<sup>1</sup>PPP: Período prepatente

<sup>2</sup>PP: Período de patência da parasitemia

\*a infecção foi determinada pelo exame de sangue a fresco e/ou qPCR sanguíneo.

ND – não detectado

As curvas de parasitemia obtidas de camundongos BALB/c inoculados com TS ou TM da cepa Colombiana pelas vias IP, IG, oral, cutânea e ocular estão representadas nas figuras 1A e 1C. De maneira geral, os resultados obtidos mostram que o número de parasitos detectados nos grupos de animais infectados com TS (figura 1A) foi significativamente superior ao encontrado nos animais infectados pelas formas TM (figura 1C), quando utilizadas as mesmas vias de inoculação.

Também foi observada a influência da via de inoculação nos níveis de parasitemia. Quando os animais foram inoculados com TS os maiores níveis de parasitemia foram detectados nos animais que receberam o parasito pela via IP, seguidos pelos infectados pela via oral e IG. Entre os animais infectados com TM foi detectada uma influência menos marcante da via de inoculação nos níveis de parasitemia, em relação aos animais inoculados com TS. Entretanto, níveis maiores de parasitemia foram detectados no sangue periférico dos animais infectados pelas vias oral e IG em relação aqueles inoculados pelas vias IP e ocular.

Os animais infectados pela via cutânea não apresentaram parasitemia patente no período avaliado.

As figuras 1B e 1D apresentam a média da área sob a curva de parasitemia obtida de cada animal, permitindo uma análise mais precisa da influência da via de inoculação nos níveis parasitêmicos. Nesta figura fica evidente que nos animais infectados pela via IP com TS, o número de parasitos circulantes foi maior em relação a todos os outros grupos experimentais.

Em conjunto, esses resultados mostram que houve diferença estatística quando foram comparadas as diferentes origens do tripomastigota numa mesma via de inoculação, sendo que nos animais infectados com TS foi detectada maior carga parasitária no sangue em relação aos animais infectados com TM.

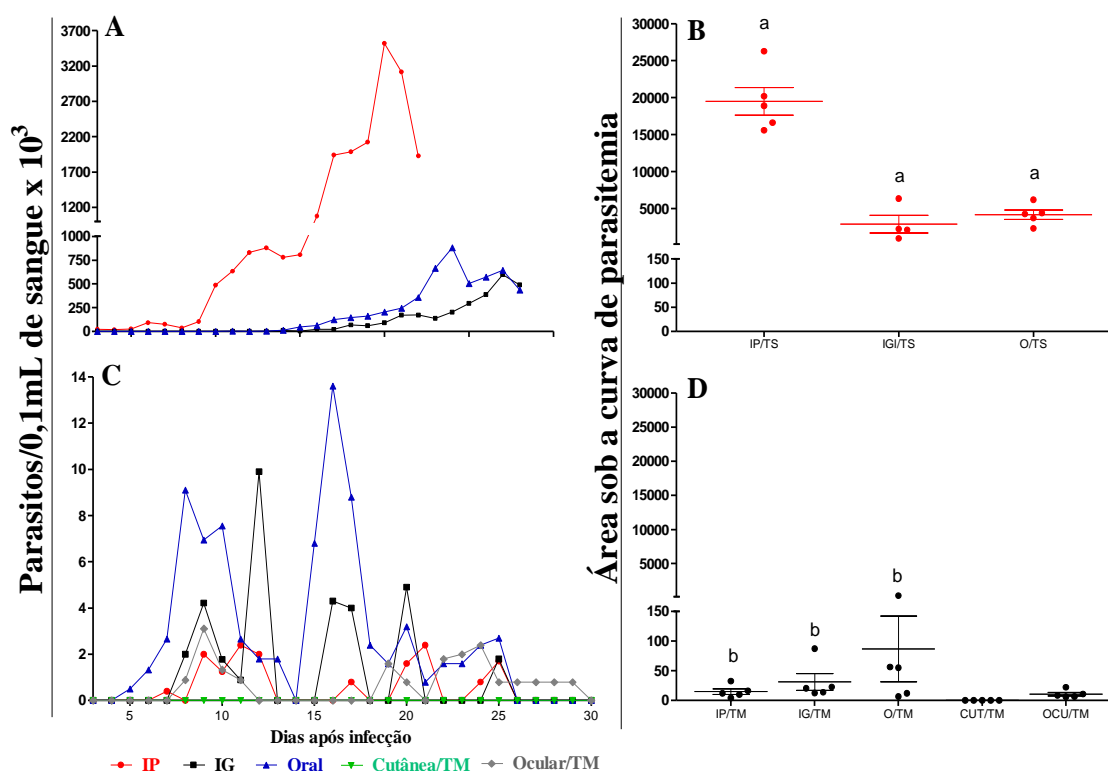


Figura 1: Parasitemia média obtida de camundongos BALB/c inoculados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). (A) curva de parasitemia dos animais infectados com TS; (B) área sob a curva de parasitemia dos animais infectados por TS; (C) curva de parasitemia dos animais infectados com TM; (D) área sob a curva de parasitemia de cada um dos grupos experimentais infectados com TM. Nos gráficos B e D letras diferentes indicam diferença significativa entre grupos inoculados pela mesma via ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.3 Distribuição tecidual do parasito

A qPCR foi utilizada para a quantificação da carga parasitária diretamente nos seguintes tecidos: língua, bochecha, estômago, jejuno, cólon, baço, fígado, coração, músculo esquelético e cérebro de camundongos experimentalmente infectados.

Para esta avaliação foram inicialmente gerados padrões de quantificação do *T. cruzi* específicos para cada tecido, a partir da diluição do DNA da cepa Colombiana do *T. cruzi* em DNA extraído dos diferentes tecidos de camundongos. Conforme pode ser observado nas figuras 2A, 2B e 2C, a reação de qPCR desenvolvida para a quantificação do *T. cruzi* em diferentes tecidos apresenta alta eficiência de amplificação e alto coeficiente de correlação de Pearson ( $R^2$ ) superiores a 88% e a 0,98, respectivamente, para todos os tecidos avaliados. Estes resultados mostram que a técnica foi capaz de quantificar o parasito numa faixa linear



variando de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^0$  parasitos/25  $\mu$ g de DNA em reações multiplex de qPCR pelo sistema TaqMan, tendo o TNF-alfa utilizado como controle interno da reação.

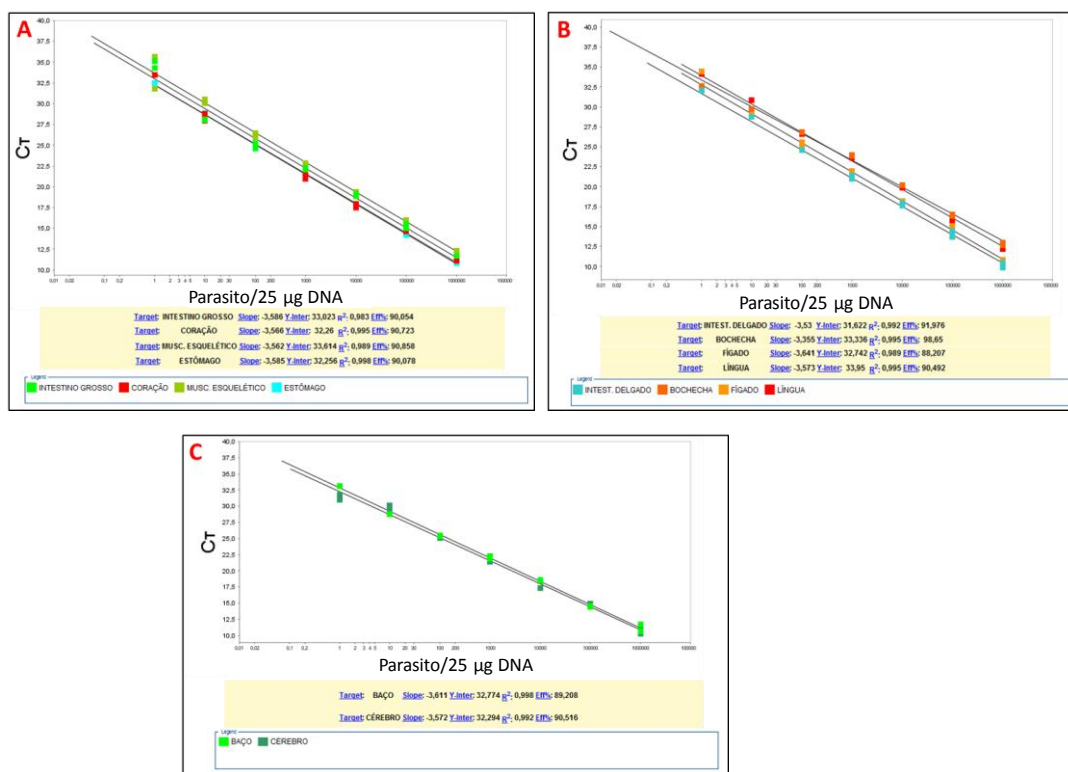


Figura 2: Faixa de linearidade da PCR em tempo real quantitativa. Curvas de amplificação da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* geradas a partir de diluições seriadas 1:10 do DNA do parasito em 25  $\mu$ g/mL do DNA dos diferentes tecidos, partindo-se da concentração inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos/25  $\mu$ g de DNA, os quais foram submetidos à quantificação do parasito e detecção do controle endógeno (TNF- $\alpha$ ) em reações multiplex. Os quadrados coloridos das faixas de linearidade indicam as amplificações das diferentes concentrações do DNA do parasito nos variados tecidos, conforme representado nas legendas.

A: Cólón, coração, músculo esquelético e estômago. B: Jejunó, bochecha, fígado e língua. C: Baço e cérebro.

A partir da identificação da faixa de linearidade dos padrões gerados, foram escolhidos 5 pontos de diluição de cada padrão para serem utilizados como curvas padrão nas quantificações do *T. cruzi* nos tecidos oriundos dos camundongos submetidos às infecções experimentais.

As figuras 3A e 3B apresentam as curvas padrão geradas a partir das amplificações do DNA de  $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^2$  epimastigotas/25 ng de DNA para os respectivos tecidos de camundongos alvos de investigação. É possível observar que a diluição do DNA do parasito no DNA dos diferentes tecidos não interferiu na amplificação, ou seja, independentemente do tipo de tecido, os números de ciclos de amplificação para a geração de fluorescência suficiente para atingir o limiar “threshold” variaram apenas ligeiramente para as mesmas concentrações de parasito. O controle endógeno (DNA do TNF- $\alpha$ , em azul) foi utilizado como controle interno da extração e amplificação de DNA das amostras.

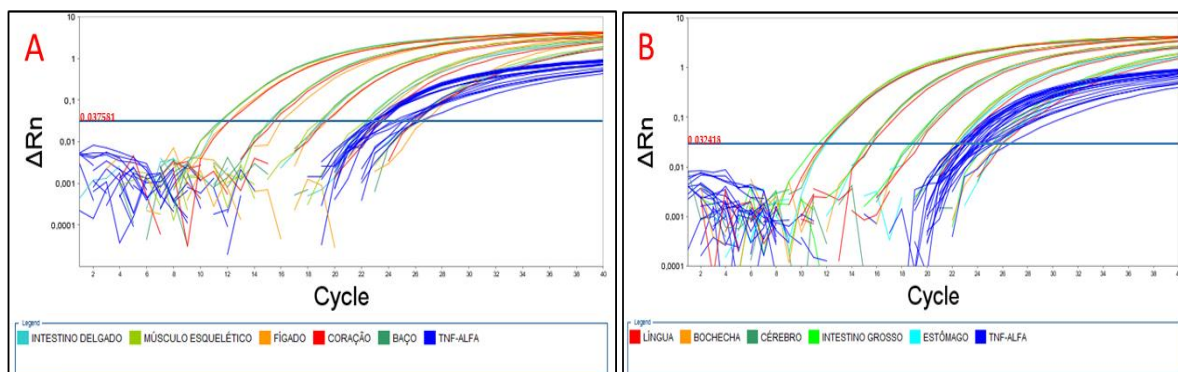


Figura 3: Curvas de amplificação geradas a partir de 5 diluições seriadas (1:10) do DNA de epimastigotas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* em 25 µg/mL de DNA dos respectivos tecidos, partindo-se de  $1 \times 10^6$  epimastigotas/25 µg de DNA. As curvas geradas foram utilizadas na quantificação do DNA do parasito e detecção do controle endógeno em reações multiplex no (A) jejuno (azul claro), músculo esquelético (verde claro), fígado (laranja), coração (vermelho) e baço (verde escuro), (B) língua (vermelho), bochecha (laranja), cérebro (verde escuro), cólon (verde claro) e estômago (azul claro). Em ambas as figuras as linhas em azul indicam a amplificação do controle endógeno (TNF- $\alpha$ ) dos padrões gerados.

A partir das curvas padrão criadas, foi possível quantificar o parasitismo dos seguintes tecidos: língua, bochecha, estômago, jejuno, cólon, baço, fígado, coração, músculo esquelético e cérebro dos animais infectados com tripomastigotas sanguíneos ou metacíclicos por diferentes vias de inoculação.

De forma geral, os nossos resultados mostraram que a carga parasitária detectada nos diferentes tecidos durante a fase aguda da infecção de camundongos BALB/c pela cepa Colombiana foi marcadamente influenciada pela origem do tripomastigota e pela via de inoculação utilizada na infecção dos animais.

As figuras 4 A e 4 B mostram os níveis de parasitismo detectados no fígado de animais infectados por diferentes vias, com TS (vermelho) ou TM (preto) aos 15 e 30 dias de infecção (dai) respectivamente. Nos animais infectados com TS o parasito foi detectado no em 100% (4/4) das amostras de tecido hepático obtidas de animais inoculados via IP e em 25% (1/5) dos inoculados via oral, enquanto o DNA do *T. cruzi* não foi detectado em nenhum dos animais que receberam o parasito via IG. Neste período, o parasitismo foi mais intenso nos animais inoculados via IP. Aos 30 dai não foi possível detectar parasitos neste tecido em nenhum dos animais infectados com TS, independente da via de inoculação.

Entre os animais infectados com TM o DNA do *T. cruzi* foi detectado em 100% das amostras de tecido hepático coletadas dos animais inoculados via IP (5/5), oral (4/4) e IG (4/4), e em 33% (1/3) dos animais inoculados via ocular aos 15 dai. Neste período não foi detectado o DNA de *T. cruzi* em nenhuma amostra tecidual coletada dos animais inoculados via cutânea. O maior nível de parasitismo foi detectado em amostras de tecido coletadas dos

animais infectados por via oral (21.091 parasitos/25  $\mu\text{g}$  de DNA), seguidos pela via IG (12.616 parasitos/25  $\mu\text{g}$  de DNA) e IP (201 parasitos/25  $\mu\text{g}$  de DNA). Interessantemente, no único animal positivo via cutânea foi detectado altos níveis de parasito (21.255 parasitos/25  $\mu\text{g}$  de DNA). Na mesma avaliação realizada aos 30 dai, foi observada uma redução do parasitismo hepático nas amostras teciduais coletadas dos animais inoculados por TM, sendo detectados 17 parasitos/ 25  $\mu\text{g}$  de DNA pela via IP, 13 parasitos/ 25  $\mu\text{g}$  de DNA pela via IG e 123 parasitos/ 25  $\mu\text{g}$  de DNA pela via oral. Neste período foram detectados parasitos em 33% (1/ 3) dos animais inoculados pela via cutânea, enquanto na via ocular foi encontrado parasitos em todos os animais. Os grupos infectados por TM, em geral, apresentaram parasitismo no fígado, mais frequente e intenso em relação aos animais infectados por TS. Aos 15 dai foi observado níveis de parasitismo 33 vezes maior pela via IP e cerca de 23.000 vezes pela via oral nos animais inoculados com TM em relação aos que receberam TS.

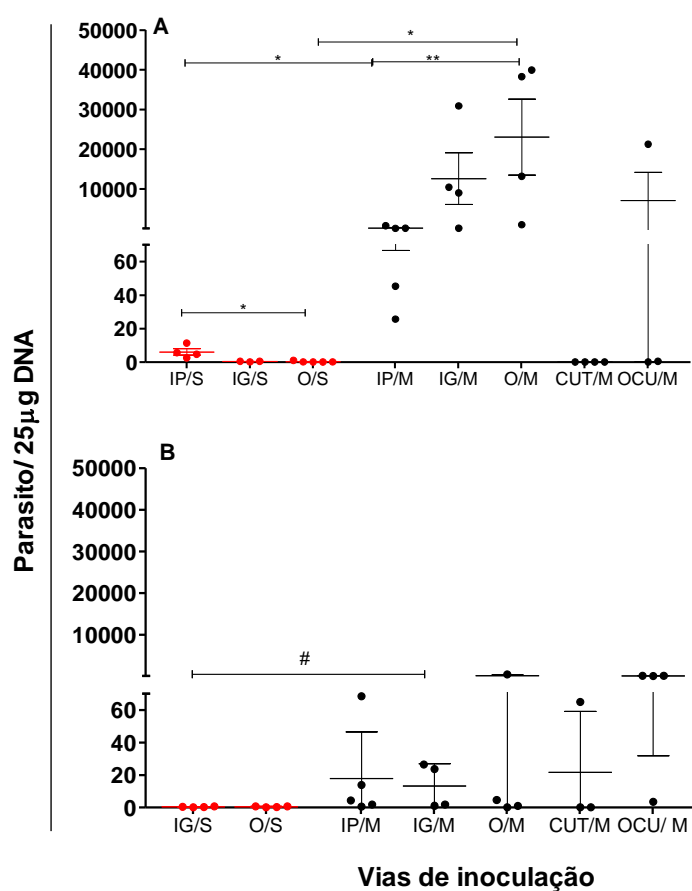


Figura 4: Parasitismo detectado por PCR em tempo real nos fígado de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) do *Trypanosoma cruzi* (cepa colombiana) pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 (A) e 30 dai (B). \* $p=0,0159$ , \*\* $p=0,0079$  e # $p=0,0286$ .

As figuras 5A e 5B mostram o parasitismo no baço de animais infectados por diferentes vias de inoculação, seja por TS ou por TM. Aos 15 dai, nos animais inoculados com TS, pode-se observar um parasitismo maior e mais frequente em 100% nos animais infectados pela via IP com média de 6 parasitos /25 µg de DNA. Entre os animais infectados pelas vias IG e oral foram detectados parasitos apenas em 33% (1/3) e 20% (1/5) dos animais, respectivamente. Aos 30 dai (figura 5B), nos animais infectados por TS, foi possível detectar parasitos apenas no grupo infectado pela via oral e em apenas 25% (1/4) dos animais.

Nos grupos de animais infectados por TM foi observado outro perfil de parasitismo. Aos 15 dai (figura 5A) foram detectados parasitos em 100% dos animais dos grupos infectados pelas vias IP, IG e oral, sendo as médias de parasitismo 1.362, 18.119, 25.115 parasitos/25 µg de DNA, respectivamente. Na via cutânea foram detectados parasitos em 50% (2/4) dos animais com média de 45 parasitos/ 25 µg de DNA e na via ocular apenas em 33% (1/3) dos animais o parasito foi detectado. Aos 30 dai, nos animais inoculados via IG, foi detectado o maior nível de parasitismo no baço com 425 parasitos/25 µg de DNA, seguido pela via IP com 407 parasitos/25 µg de DNA e por último a via oral com 304 parasitos/ 25 µg de DNA. Nos animais infectados pela via cutânea foram detectados parasitos em apenas 33,3% (1/3) (cerca de 10 parasitos) e na via ocular em todos os animais do grupo foram detectados parasitos em uma média de 1.980 parasitos/ 25 µg de DNA.

O parasitismo no baço foi mais intenso quando os animais foram infectados por TM quando comparado aos infectados por TS, sendo 166 vezes maior na via IP, 3.316 vezes maior na via IG e 10.732 vezes maior na via oral aos 15 dai. Aos 30 dai o parasitismo detectado na via oral foi 62,5 vezes maior quando infectado por TM e pela IG não foi detectado parasito nos animais inoculados com TS.

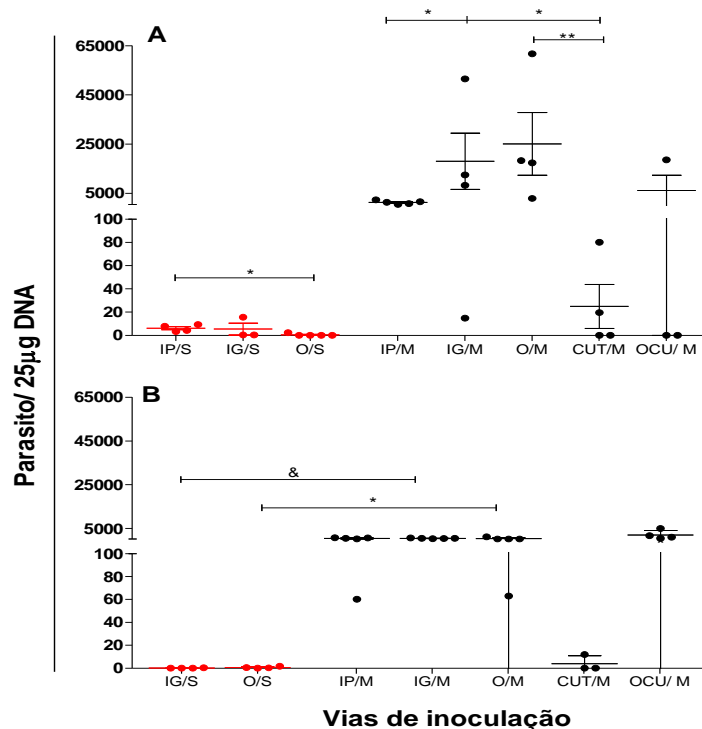


Figura 5: Parasitismo detectado por PCR em tempo real no baço de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) do *Trypanosoma cruzi* (cepa Colombiana) pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 (A) e 30 dai (B). \* $p=0,0159$ , \*\* $p=0,0286$ , # $p=151$  e & $p=0,0179$ .

A figura 6 mostra o parasitismo detectado em amostras de coração coletadas de animais infectados pelas diferentes vias de inoculação por TS e TM aos 15 (figura 6A) e 30 (figura 6B) dai. Na infecção por TS, ao contrário do que foi encontrado no baço e fígado, foi possível detectar parasitos em 100% dos animais dos grupos inoculados pelas vias IP, IG e oral nos dois períodos avaliados. Estes resultados confirmam o miotropismo mostrado previamente para a cepa Colombiana do *T. cruzi* (ANDRADE; ANDRADE, 1968). Aos 15 dai (figura 6A), os animais inoculados via IP foram os que apresentaram maior intensidade de parasitos (média de 320 parasitos/ 25  $\mu$ g de DNA), seguida pelos inoculados via oral (média de 40 parasitos) e por último pela via IG (média de 18 parasitos). Aos 30 dai, foi observado aumento no nível do parasitismo tecidual, tendo sido detectado uma média de 268 parasitos/25  $\mu$ g de DNA nas amostras coletadas de animais inoculados via oral e de 195/25  $\mu$ g de DNA parasitos naqueles que receberam o parasito via IG.

Na infecção por TM, aos 15 dai, o maior nível de parasitismo foi detectado nos animais inoculados via IP (6.048 parasitos/ 25 µg de DNA), seguida pela via IG (5.637 parasitos/ 25 µg de DNA), via oral (5.385 parasitos/ 25 µg de DNA), via ocular (1.917 parasitos/ 25 µg de DNA) e via cutânea (3 parasitos/ 25 µg de DNA). Na via cutânea apenas em 50% (2/4) dos animais o parasito foi detectado no coração e na via ocular em apenas 33,3% (1/3) dos animais. Na mesma avaliação realizada aos 30 dai, e como observado nos outros tecidos supracitados, houve uma redução no parasitismo nos animais inoculados via IP e oral (cerca de 20 e 4 vezes, respectivamente). No entanto, naqueles que receberam o parasito via IG a carga parasitária praticamente dobrou (12.009 parasitos/ 25 µg de DNA). Nos animais inoculados via cutânea novamente foi possível detectar parasitos em apenas 33% (1/3), enquanto 100% dos inoculados via ocular foram positivos com média de 7.118 parasitos/ 25 µg de DNA.

De forma geral pode-se observar, mais uma vez, que o parasitismo tecidual detectado nos grupos de animais infectados por TM (exceto via cutânea) foi maior que nos animais infectados por TS. Interessantemente, neste tecido foi detectada uma tendência de aumento da carga parasitária com o decorrer da infecção, tendo sido detectado 10 vezes (IG/TS), 7,4 vezes (oral/TS), 1,95 vezes (IG/TM) e 3,7 vezes (ocular/TM) mais parasitos aos 30 dai em relação aos 15 dai.

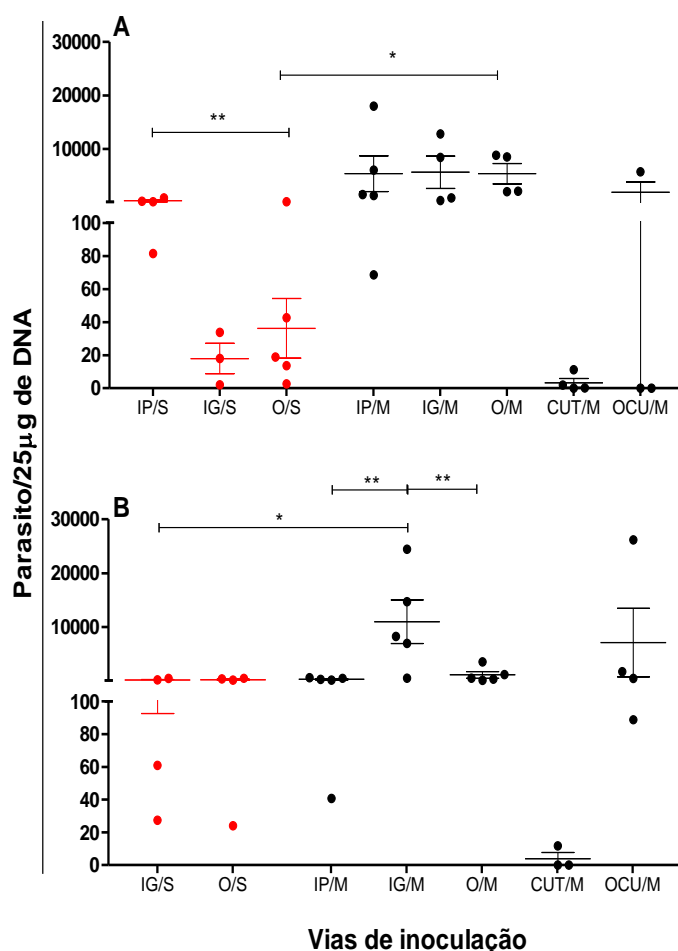


Figura 6: Parasitismo detectado por PCR em tempo real no coração de camundongos infectados com  $1 \times 10^6$  formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicas (preto) do *Trypanosoma cruzi* (cepa Colombiana) pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 (A) e 30 dai (B). \* $p=0,0159$  e \*\* $p=0,0317$ .

O parasitismo quantificado nos outros tecidos coletados na necropsia: bochecha, língua, trato gastrointestinal, músculo esquelético e cérebro estão apresentados na tabela 3. Inicialmente foi comparada a frequência de resultados positivos no ensaio qPCR nas amostras coletadas da bochecha/língua, trato gastrointestinal (TGI) e músculo esquelético (ME), considerando uma mesma via de inoculação. Nos tecidos coletados de animais inoculados via IP o DNA do parasito foi detectado em 92 a 100% dos tecidos dos animais inoculados com TS e TM aos 15 e 30 dai, com exceção do TGI dos animais inoculados com TM, onde a positividade foi de 66.66% (10/15).

Nos animais inoculados via oral o DNA do *T. cruzi* foi detectado em alta frequência no ME dos animais inoculados com TS aos 15 dai (60%) e aos 30 dai (100%). Por outro lado

a detecção do parasito foi menos frequente na bochecha/língua (20 a 40%) e no TGI (6,66 a 20%) aos 15 e 30 dai, respectivamente. Nos animais inoculados com TM pela mesma via, o DNA do parasito foi detectado em 100% das amostras de ME e bochecha/língua e em 85,33% (10/12) e 93,33% das amostras do TGI coletadas aos 15 e 30 dai, respectivamente.

De forma semelhante, quando os animais foram inoculados pela via IG a frequência de amostras teciduais positivas foi maior entre os animais inoculados com TM, em relação aos inoculados com TS, sendo esta diferença menos marcante no músculo esquelético.

De forma geral, a intensidade do parasitismo seguiu o mesmo perfil detectado no fígado, coração e baço, onde o parasitismo tecidual foi detectado com maior frequência e intensidade nos animais inoculados com TM, em relação aos infectados com TS.

A frequência de parasitismo na bochecha/língua, TGI e ME foi menor entre os animais inoculados com TM via cutânea e ocular aos 15dai (Tabela 3), em relação aos animais inoculados via IP, oral e IG. Este mesmo resultado foi observado aos 30 dai entre os animais inoculados via cutânea. De forma diferente, a frequência do parasitismo tecidual foi 100% na bochecha/língua e ME e de 75% no TGI dos animais infectados via ocular. Estes resultados sugerem que a distribuição tecidual ocorreu mais tardiamente nos animais inoculados via ocular, uma vez que aos 15 dpi apenas em 1 dos 3 animais eutanasiados o parasito foi detectado nas amostras de todos os tecidos analisados. Deve se lembrado, ainda, que neste grupo de animais o parasito passou a ser detectado pelo exame de sangue a fresco apenas a partir do 17,4 dias após a inoculação.

A detecção do DNA do *T. cruzi* em amostras do tecido cerebral mostrou que o parasitismo foi mais frequente e mais intenso nos animais inoculados com TM, em relação à TS, considerando a mesma via de inoculação (Tabela 3). Nos animais inoculados com TS o DNA do *T. cruzi* não foi detectado (via IP) ou foi detectado em no máximo 40% (via oral) ou 33% (via IG) das amostras coletadas aos 15 e 30 dai. Diferentemente do que foi observado na infecção por TS, o DNA do parasito foi detectado em amostras do cérebro de 50% dos animais inoculados via IP, em 100% dos inoculados via oral e IG, em 14,28% na via cutânea e em 42,8% na via ocular, considerando os animais eutanasiados nos 15 e 30 dai. Além disso, a carga parasitária detectada foi significativamente maior nas amostras coletadas dos animais inoculados via oral e IG. Estes resultados mostram uma maior disseminação do parasito no cérebro nas infecções por TM, que também foi marcadamente influenciada pela via de inoculação.



De forma geral o ME foi o tecido mais frequentemente positivo, independente da via de inoculação ou da origem do tripomastigota. Adicionalmente, o ME foi o tecido que apresentou maior carga parasitária dentre os animais infectados por TM (média de 2.436 parasitos/25 µg de DNA) independente da via de inoculação, seguido por bochecha/língua (média de 714 parasitos/25 µg de DNA), cérebro (média de 610 parasitos/25 µg de DNA) e TGI (média de 196 parasitos/25 µg de DNA).

Tabela 3: Perfil do parasitismo tecidual de camundongos BALB/c inoculados com tripomastigotas metacíclicos ou sanguíneos da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* de acordo com cada via de inoculação aos 15 e 30 dias de infecção.

Via de inoculação	Origem do tripomastigota	Dias de infecção	Nº animais +/total (média nº parasitos ± DP <sup>3</sup> )			
			Bochecha /Língua	TGI <sup>1</sup>	ME <sup>2</sup>	Cérebro
<b>Intraperitoneal</b>	Sanguíneo	15	<b>8/8</b> (15,29 ± 10,4)	<b>11/12</b> (47,13 ± 33,4)	<b>4/4</b> (39,8 ± 22)	<b>0/4</b>
		30	-	-	-	-
	Metacíclico	15	<b>10/10</b> (187,6 ± 191,5)	<b>15/15</b> (181,1 ± 204,5)	<b>5/5</b> (411,2 ± 389,7)	<b>2/5</b> (3,05 ± 0,46)
		30	<b>10/10</b> (76,3 ± 77,1)	<b>10/15</b> (111,15 ± 223,4)	<b>5/5</b> (422,8 ± 604,5)	<b>3/5</b> (2,97 ± 2,94)
<b>Oral</b>	Sanguíneo	15	<b>2/10</b> (3,54 ± 0,4)	<b>1/15</b> (1,02)	<b>3/5</b> (3,1 ± 2,7)	<b>1/5</b> (1,04)
		30	<b>4/10</b> (2,19 ± 1,05)	<b>3/15</b> (7,11 ± 8,2)	<b>4/4</b> (4,42 ± 3,31)	<b>2/5</b> (1,14 ± 0,07)
	Metacíclico	15	<b>8/8</b> (2450,1 ± 1796,7)	<b>10/12</b> (301,2 ± 432,4)	<b>4/4</b> (5629,5 ± 3885,7)	<b>4/4</b> (1623,9 ± 3201,8)
		30	<b>10/10</b> (134,1 ± 116,9)	<b>14/15</b> (431,7 ± 1088,8)	<b>5/5</b> (726,5 ± 916,3)	<b>5/5</b> (645,2 ± 597)
<b>Intragástrica</b>	Sanguíneo	15	<b>3/6</b> (1,69 ± 2,71)	<b>2/9</b> (5,3 ± 14,6)	<b>2/3</b> (4,04 ± 5,1)	<b>1/3</b> (6,5)
		30	<b>4/8</b> (2,2 ± 4,2)	<b>5/12</b> (2,11 ± 3,5)	<b>3/4</b> (8,11 ± 6,6)	<b>1/5</b> (1,07)
	Metacíclico	15	<b>8/8</b> (1893,7 ± 2520,9)	<b>12/12</b> (237,2 ± 374,6)	<b>4/4</b> (2852,8 ± 2839,1)	<b>4/4</b> (304 ± 428,7)
		30	<b>10/10</b> (429,8 ± 502,6)	<b>15/15</b> (400,4 ± 450,3)	<b>5/5</b> (2673,1 ± 2278)	<b>5/5</b> (1841,7 ± 3595,7)
<b>Cutânea</b>	Metacíclico	15	<b>3/8</b> (2,8 ± 1,24)	<b>1/12</b> (1,184)	<b>2/4</b> (13,45 ± 24,9)	<b>1/4</b> (3,2)
		30	<b>1/6</b> (51,6)	<b>1/9</b> (45,15)	<b>2/3</b> (18,8 ± 29,8)	<b>0/3</b>
<b>Ocular</b>	Metacíclico	15	<b>2/6</b> (1311,7 ± 2485,1)	<b>3/9</b> (206,05 ± 356,9)	<b>1/3</b> (10952,4)	<b>1/3</b> (1673,1)
		30	<b>8/8</b> (613,45 ± 798,4)	<b>9/12</b> (46,8 ± 60,6)	<b>4/4</b> (667,5 ± 398,8)	<b>2/4</b> (2,71 ± 0,26)

<sup>1</sup>TGI:Trato gastrointestinal

<sup>2</sup>ME:Músculo esquelético

<sup>3</sup> DP: Desvio padrão

#### 5.2.4 Análises histopatológicas quantitativas e semi-quantitativas

A intensidade da inflamação induzida pela infecção por *T. cruzi* foi avaliada pela contagem do número de núcleos celulares dos tecidos hepático e muscular cardíaco e pela área média dos folículos linfóides do baço. Nos demais tecidos a inflamação foi avaliada de forma semi-quantitativa.

Nas figuras 7A e 7B estão apresentados os resultados da contagem de núcleos celulares em uma área de  $355400\mu\text{m}^2$  do tecido hepático coletado dos animais inoculados com TS e TM e dos animais não infectados.

Na avaliação realizada aos 15 dai (figura 7A), nos tecidos coletados dos animais inoculados por TS, apenas no grupo inoculado via oral foi observado um aumento significativo do número de células em relação aos animais não infectados. Já aos 30dai (Figura 7B), tanto nos animais inoculados pela via IG, quanto pela via oral, foi quantificado um número significativamente maior de células em relação ao grupo CNI. Na análise histopatológica os tecidos dos animais inoculados por TS não apresentaram alterações aos 15 dai, sendo observado processo inflamatório discreto aos 30 dai.

Nos grupos de animais inoculados por TM, aos 15 dai, (Figura 7A) é possível observar que apenas o grupo infectado pela via IP apresentou diferença do número de células em relação ao CNI. Foi observado processo inflamatório focal ou multifocal discreto nos animais infectados pelas vias IP, IG e oral por TM enquanto os animais inoculados pelas outras vias apresentaram aspecto normal do órgão. Degeneração hidrópica e presença de raros ninhos de amastigotas foram observados nos animais infectados pela via oral/TM. De forma diferente, aos 30 dai (Figura 7 B) todos os animais inoculados com TM, com exceção dos animais infectados via cutânea, apresentaram nível de celularidade maior que os animais não infectados. Na análise histopatológica foi observado, novamente, processo inflamatório discreto nos animais dos grupos inoculados pelas vias IP, IG, oral e ocular. É interessante ressaltar que apesar de ter sido detectado maior parasitismo hepático nos animais inoculados com TM o processo inflamatório, neste tecido, foi semelhante entre os animais inoculados com TM e TS, considerando a mesma via de inoculação. As figuras 8 e 9 mostram as fotomicrografias representantes dos cortes histológicos obtidos do fígado dos animais dos diferentes grupos experimentais aos 15 e 30 dai, respectivamente.

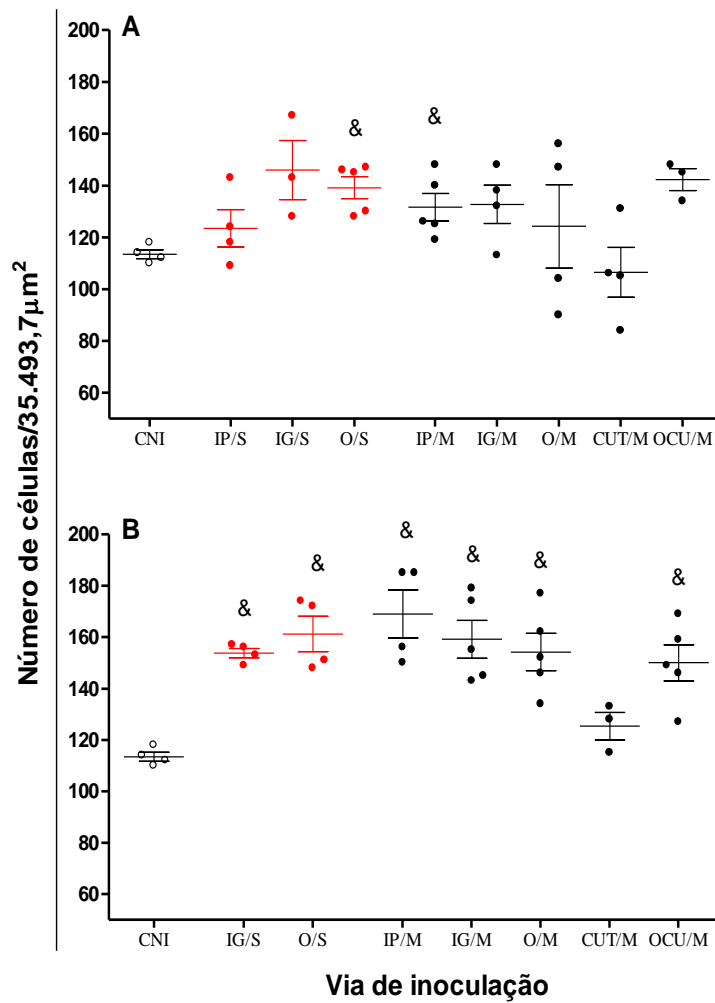


Figura 7: Quantificação do número de células no tecido hepático de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 (A) e 30 dai (B) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. &: indica diferença em relação ao grupo CNI ( $p < 0,05$ ).

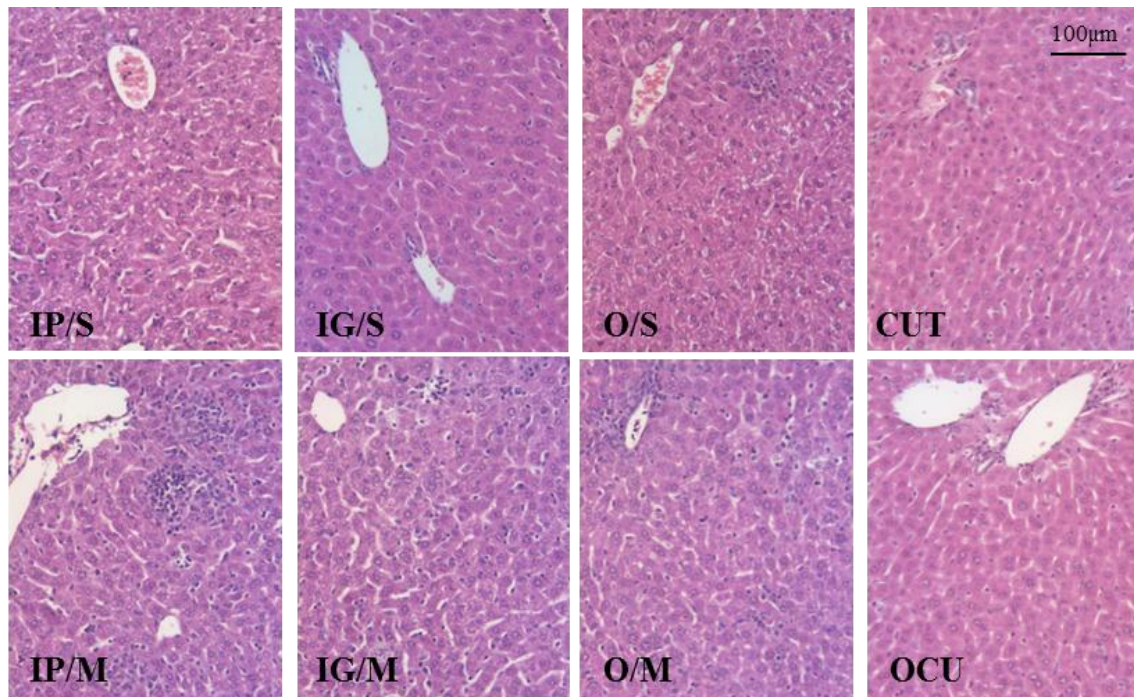


Figura 8: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 100µm.

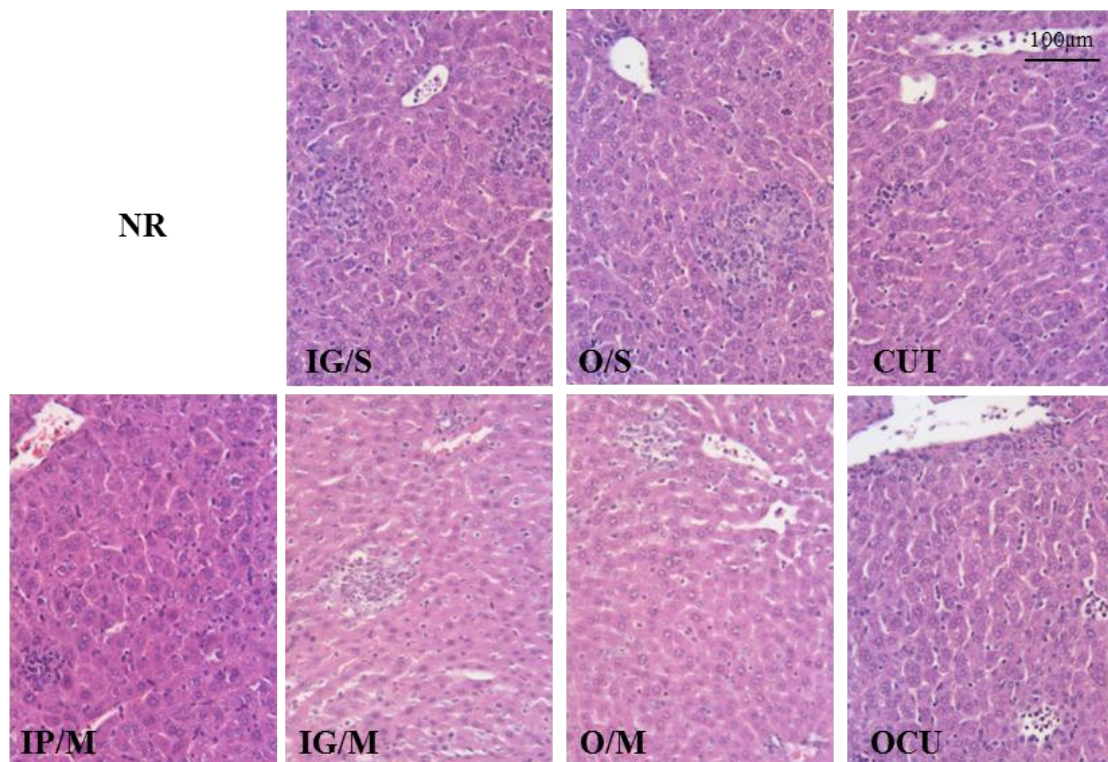


Figura 9: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 30 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 100µm. NR: não realizado

A análise do processo inflamatório no baço foi determinada pela área média dos folículos linfóides. O aumento desta área pode indicar um aumento na polpa branca do baço, que poderia ser relacionada com a intensidade da resposta imune. Na mensuração dessa área foi possível observar que, tanto aos 15 (Figura 10A) quanto aos 30 (figura 10B) dai, os animais dos grupos infectados por TS, pelas diferentes vias de inoculação, apresentaram área maior que a encontrada nos animais controles não infectados (não significativo apenas em IG/TS aos 15 dai) . Entre os animais inoculados com TM foi observada hiperplasia da área folicular média, que foi significativamente maior do que a observada no grupo CNI aos 15 dai, independente da via de inoculação. Esta diferença foi menos marcante aos 30 dai, pois neste período apenas nos animais do grupo inoculado pela via ocular/TM foi observada diferença significativa da área média folicular em relação aos animais normais.

Não foi detectada influência da origem do tripomastigota na área folicular do baço aos 15 dai, considerando a mesma via de inoculação e foi observado presença de nódulos reativos em todos os grupos de animais infectados. De forma diferente, aos 30 dias de infecção a hiperplasia na área folicular no baço foi significativamente maior nos animais infectados com TS, em relação aos inoculados com TM. As figuras 11 e 12 apresentam fotomicrografias representativas dos cortes histológicos obtidos do baço dos animais dos diferentes grupos experimentais aos 15 e 30 dai, respectivamente.

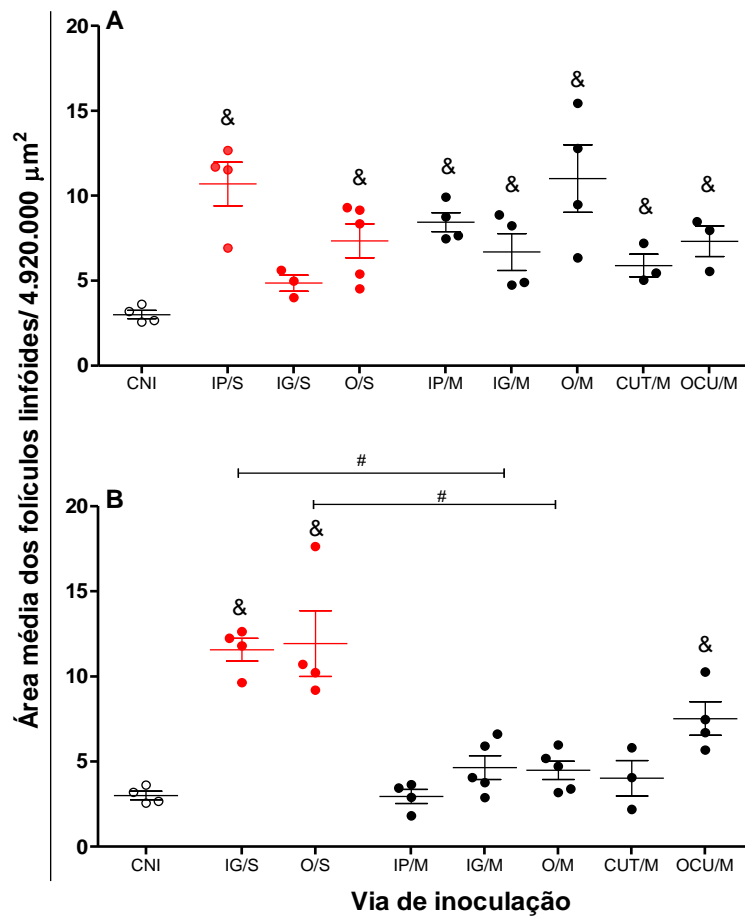


Figura 10: Quantificação da área média dos folículos linfóides no baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (daí) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. &: significa diferença em relação ao grupo CNI ( $p < 0,05$ ). #: significa diferença entre os animais inoculados pela mesma via quando se altera a origem do tripomastigota ( $p < 0,05$ ).

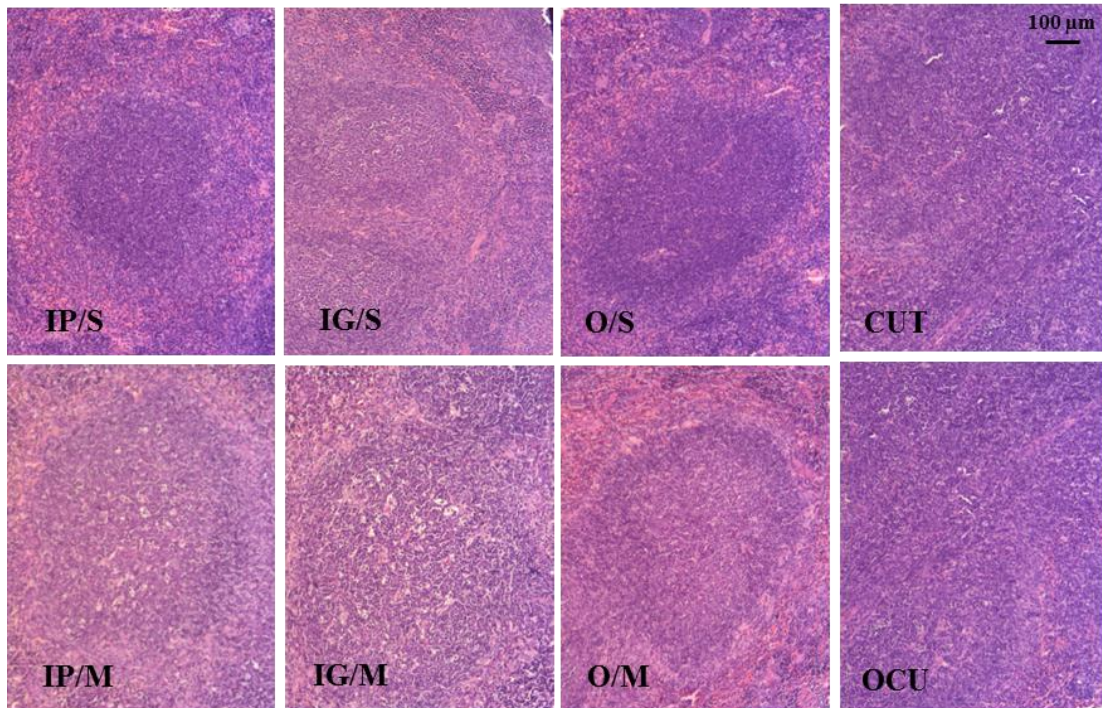


Figura 11: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 100µm.

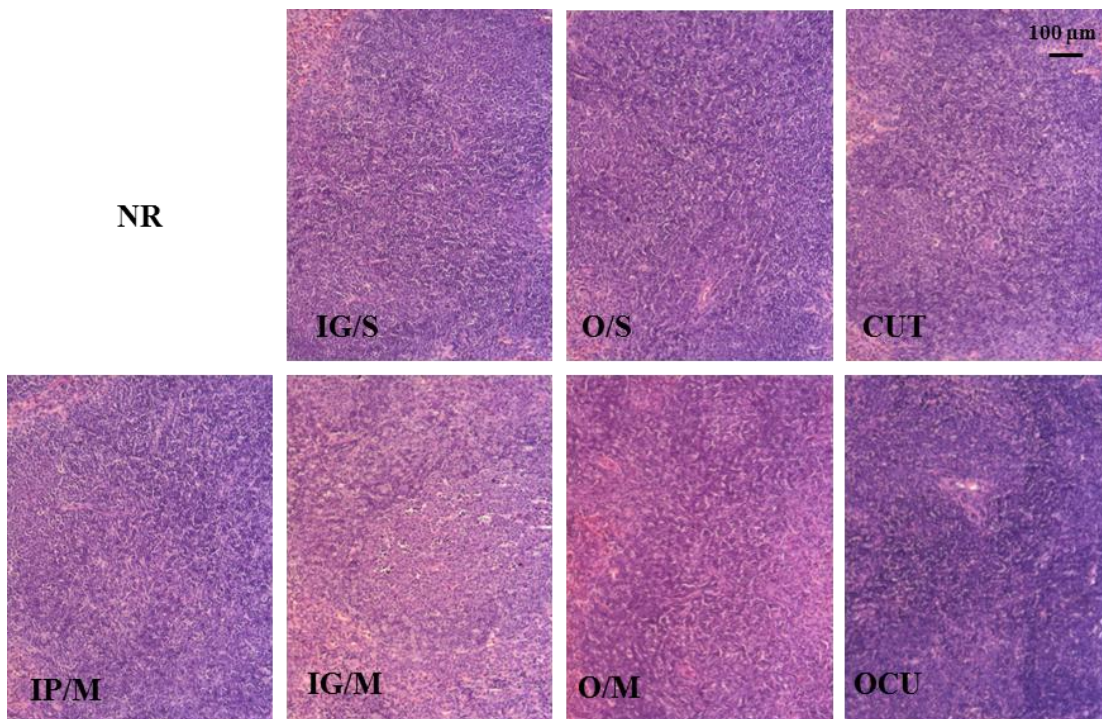


Figura 12: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de baço de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 30 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 100µm. NR: não realizado.

A avaliação da miocardite foi realizada pela contagem dos núcleos celulares nos cortes histológicos corados pela Hematoxilina & Eosina. A análise realizada nos tecidos coletados dos animais 15 dias após a inoculação mostrou ausência de inflamação no tecido cardíaco de todos os animais infectados, independente da origem do tripomastigota ou da via de inoculação (figura 13 A). Neste período apenas nos animais infectados por TS, via IP, o número de núcleos celulares foi maior do que o detectado nos animais CNI, porém sem diferença estatística.

Aos 30 dai, nos animais inoculados com TS foi detectado um aumento da miocardite em todos os grupos experimentais, sendo observado um aumento de cerca de duas vezes no número de núcleos celulares quantificados nos animais inoculados via oral e IG. Neste período o número de núcleos celulares detectados nos animais infectados foi significativamente superior em relação ao grupo CNI (Figura 13B).

Também entre os animais inoculados com TM foi possível detectar o aumento da miocardite com o decorrer da infecção. Aos 30 dai foi quantificado um número maior de núcleos celulares no tecido dos animais inoculados pelas diferentes vias, especialmente pelas vias oral, IG e ocular, onde o número de células detectadas foi significativamente maior em relação ao grupo controle não infectado.

De forma geral, os animais infectados por TS apresentaram maior inflamação no tecido muscular cardíaco, sendo esta diferença mais evidente aos 30 dai. As figuras 14 e 15 apresentam fotomicrografias representativas dos cortes histológicos obtidos do coração dos animais dos diferentes grupos experimentais aos 15 e 30 dai, respectivamente.



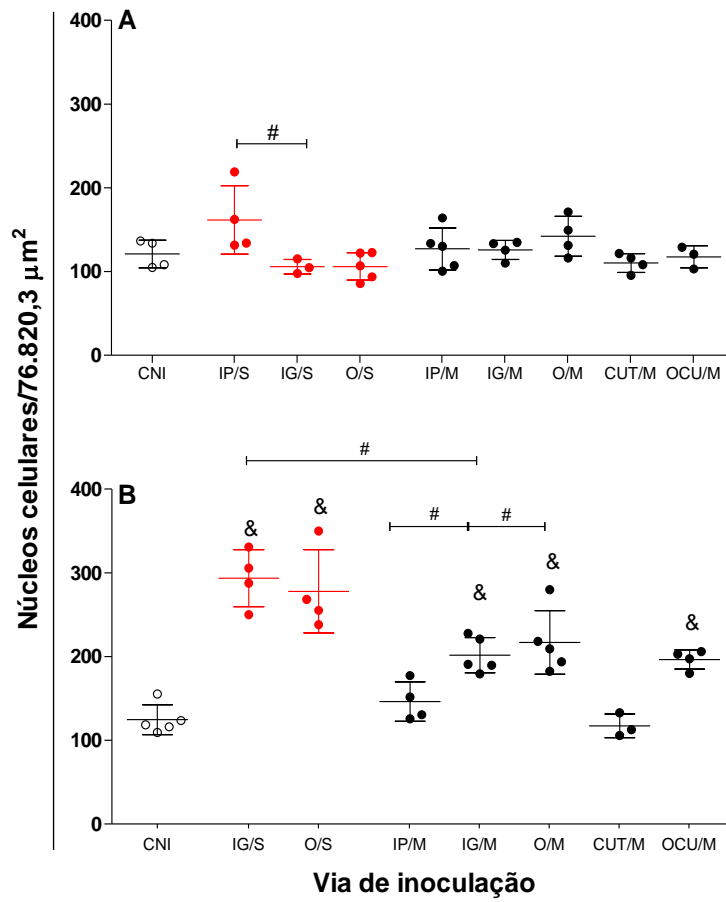


Figura 13: Quantificação de núcleos celulares no músculo cardíaco de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (daí) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. &: significa diferença em relação ao grupo CNI ( $p < 0,05$ ). #: significa diferença entre os animais inoculados pela mesma via quando se altera a origem do tripomastigota ( $p < 0,05$ ).

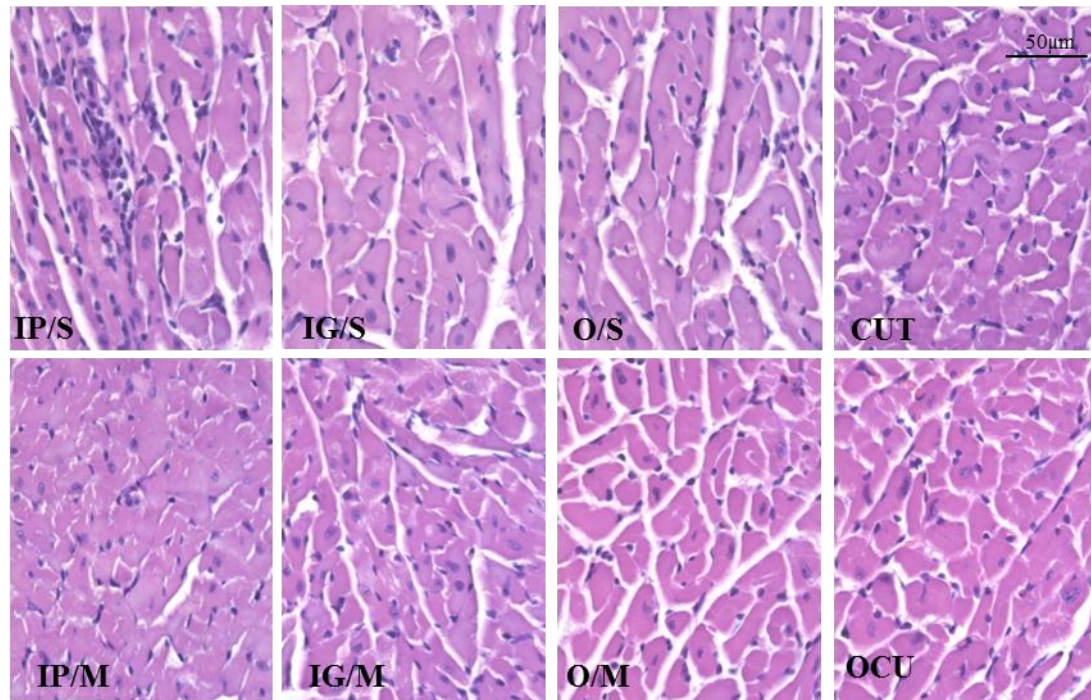


Figura 14: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de coração de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 15 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 50µm

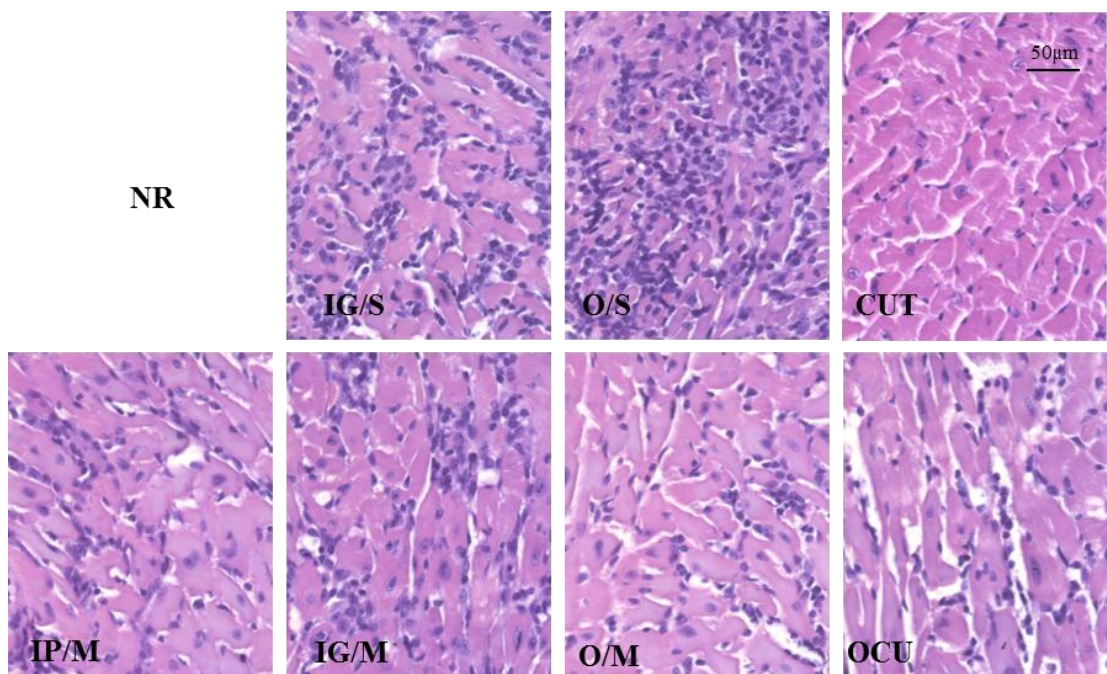


Figura 15: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de coração de camundongos BALB/c inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* pelas vias intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU) aos 30 dias após a infecção (dai). Hematoxilina-Eosina. Barra = 50µm. NR: não realizado

Os outros tecidos coletados foram analisados semi-quantitativamente e os resultados estão apresentados nas tabelas 4 e 5 a seguir. Nos animais infectados com TS (tabela 4) pode ser observado que aos 15 dai apenas os animais inoculados pela via IP apresentaram focos inflamatórios multifocais ou difusos discretos, sendo que a língua e o esôfago não apresentaram alterações histopatológicas. Já aos 30 dai é possível observar que todos os tecidos analisados apresentaram alguma alteração em relação ao controle não infectado. Os animais infectados pela via IG apresentaram número maior de tecidos com focos inflamatórios multifocais ou difuso moderado (bochecha, estômago, intestino delgado e cólon) e o músculo esquelético apresentou infiltrado inflamatório intenso.

Tabela 4: Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no cérebro, língua, bochecha, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e músculo esquelético de camundongos BALB/C infectados com formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em diferentes vias.

Tecidos	Tripomastigotas Sanguíneos						
	NI	15 dai			30 dai		
		IP	IG	Oral	IP	IG	Oral
<b>Cérebro</b>	-	+	-	-	NR	+	++
<b>Língua</b>	-	-	-	-	NR	+	+
<b>Bochecha</b>	-	+	-	-	NR	++	++
<b>Esôfago</b>	-	-	-	-	NR	+	+
<b>Estômago</b>	-	+	-	-	NR	++	++
<b>ID</b>	-	+	-	-	NR	++	+
<b>Cólon</b>	-	+	-	-	NR	++	+
<b>ME</b>	-	+	-	-	NR	+++	++

NI: não infectado IP: intraperitoneal IG: intragástrica ID: intestino delgado ME: músculo esquelético (-) Aspecto histológico normal; (+) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso discreto; (++) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso moderado; (+++) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso intenso. NR: Não realizado pois houve mortalidade de 100% aos 22° dai

A tabela 5 apresenta os resultados obtidos dos animais infectados com TM. Aos 15 dai poucos tecidos apresentaram presença de infiltrado inflamatório. Apenas os animais inoculados pela via IP no esôfago, pela via IG na bochecha e pela via oral esôfago e cólon apresentaram processo inflamatório multifocal ou difuso discreto. Já aos 30 dai os animais inoculados pela via CUT permaneceram com todos os tecidos analisados sem alteração. Os

animais do grupo inoculado pela via IG apresentaram alterações em 100% dos tecidos analisados, enquanto os animais inoculados pelas vias oral e OCU apresentaram 87,5% neste período, sendo os tecidos mais afetados: língua, bochecha, estômago, ID, cólon e ME.

É importante ressaltar que embora observada alta frequência de alterações nos animais infectados por TM, essas alterações foram mais discretas se comparadas com os animais infectados por TS. Entre os animais infectados com TM não foram observadas alterações de moderada à intensa, enquanto os animais inoculados pela via IG /TS apresentaram 62,5% de alterações de moderada à intensa e os animais inoculados pela via oral/TS apresentaram 50% de alterações moderadas.

Tabela 5: Análise histopatológica semi-quantitativa do infiltrado inflamatório no cérebro, língua, bochecha, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e músculo esquelético de camundongos BALB/C infectados com formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi* em diferentes vias de inóculo.

Tecidos	Tripomastigotas Metacíclicas										
	NI	15 dai					30 dai				
		IP	IG	Oral	CUT	OCU	IP	IG	Oral	CUT	OCU
<b>Cérebro</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<b>Língua</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<b>Bochecha</b>	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<b>Esôfago</b>	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+
<b>Estômago</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<b>ID</b>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>Cólon</b>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
<b>ME</b>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

NI: não infectado IP: intraperitoneal IG: intragástrica ID: intestino delgado ME: músculo esquelético CUT: cutâneo OCU: ocular

(-) Aspecto histológico normal; (+) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso discreto; (++) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso moderado; (+++) infiltrado inflamatório multifocal ou difuso intenso.

### 5.2.5 Peso médio do baço e fígado

Para avaliarmos se a alteração da fonte de tripomastigota e da via de inóculo poderia ter efeito no aumento da atividade do baço e fígado, foi realizada a pesagem desses órgãos. É possível observar aos 15 dai (figura 16A) que os animais do grupo inoculado pela via IP com TS apresentaram maior média de peso do baço em relação a todos os outros grupos experimentais. Nos animais infectados por TM (preto), somente os animais inoculados pela via IP e pela via OCU exibiram peso deste órgão com diferença significativa em relação ao grupo de animais não infectados. Na análise realizada aos 30 dai (figura 16B) foi observado que os animais infectados com TS (vermelho) apresentaram aumento no peso do baço, sem distinção de via de inoculação. Também houve aumento no peso do baço em alguns grupos de animais infectados com TM (IG, oral e OCU), no entanto foi menos expressivo.

De forma geral, os animais inoculados com TS apresentaram peso maior do baço nos períodos avaliados. A via IP/TS apresentou peso cerca de 9 vezes maior que o CNI aos 15 dai e as vias IG/TS e oral/TS apresentaram peso do baço cerca de 6 vezes maior que os animais sem infecção aos 30 dai.

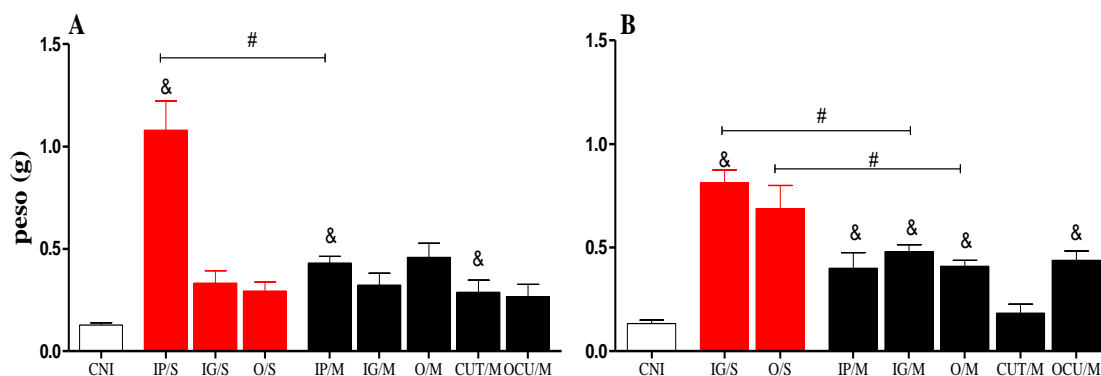


Figura 16: Peso médio do baço de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* após a infecção pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. (A) 15 dias após a infecção (dai); (B) 30 dai. &: significa diferença em relação ao grupo CNI ( $p < 0,05$ ). #: significa diferença entre os animais inoculados pela mesma via quando se altera a origem do tripomastigota ( $p < 0,05$ ).

O peso do fígado obtido durante a eutanásia dos animais está representado nas figuras 17A e 17B. Embora tenha se observado o mesmo padrão encontrado no peso do baço, com os animais inoculados com TS apresentando peso médio de fígado mais elevado tanto aos 15

quanto aos 30 dai, não foi constatada diferença significativa entre os grupos infectados nem em relação aos animais sem infecção.

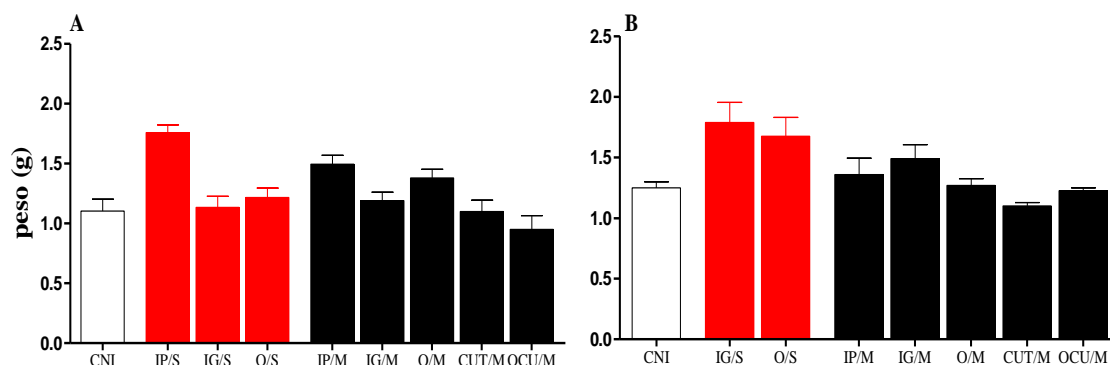


Figura 17: Peso médio do fígado de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* após a infecção pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. (A) 15 dias após a infecção (dai); (B) 30 dai.

#### 5.2.6 Quantificação de citocinas por Citometric Beads Array

O conhecimento do perfil de citocinas produzidas durante a infecção por *T. cruzi* é de extrema importância para o conhecimento da resposta imune e da sua implicação na patogênese da infecção. Neste estudo foram avaliados as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 aos 15 e 30 daí, pois estas citocinas são importantes na gênese do processo inflamatório observado na infecção por *T. cruzi*. Na figura 18 pode-se observar que o IFN- $\gamma$  foi detectado no soro de todos os animais infectados tanto aos 15 (figura 18 A) quanto aos 30 (figura 18B) dias após a infecção. Entretanto, os níveis desta citocina foram influenciados pela via de inoculação, pela origem do parasito e pelo período da infecção dos animais. Os níveis de IFN- $\gamma$ , aos 15 dai, foram maiores nos animais infectados pela via IP/TS (média de 551 pg/mL), embora nos soros dos animais inoculados com TS por via oral e IG os níveis de IFN- $\gamma$  também foram superiores aos animais do grupo CNI. Já entre os animais infectados por TM, os maiores níveis de IFN- $\gamma$  foram detectados nos soros dos animais inoculados pela via oral (427 pg/mL), seguido pela via IG (223 pg/mL) e pela via IP (152 pg/mL).

É importante ressaltar que, de maneira geral, os níveis de IFN- $\gamma$  foram similares entre os animais inoculados pela mesma via com TS ou TM, com exceção daqueles inoculados via

IP. Nestes, os níveis séricos de IFN- $\gamma$  foram significativamente maiores entre os animais inoculados com TS em relação aos que receberam TM na avaliação realizada 15 dias após a inoculação.

Na figura 18B pode-se observar uma redução dos níveis séricos de IFN- $\gamma$  em todos os grupos experimentais aos 30 dai. Neste período os níveis médios desta citocina foram cerca de 70 pg/mL nos animais inoculados por TS, enquanto naqueles inoculados por TM foi em torno de 40 pg/mL. Entretanto, todos os animais infectados apresentaram nível de IFN- $\gamma$  maior do que o detectado nos animais não infectados. Por outro lado, não foi observada influência marcante em relação à origem do tripomastigota e a via de inoculação, sendo que apenas nos animais infectados via oral foi detectada diferença significativa nos níveis desta citocina entre os camundongos inoculados com TS ou TM.

De forma semelhante, a citocina TNF- $\alpha$  foi detectada no soro de todos os grupos de animais infectados pelo *T. cruzi*. No 15<sup>o</sup> dia de infecção (figura 18 C) os níveis séricos de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores nos animais infectados, em relação ao grupo CNI, com exceção dos animais inoculados via IG e ocular. Neste período não foi observada influência marcante da via de inoculação ou da origem do tripomastigota nos níveis desta citocina, com exceção dos animais do grupo IP/TS. É importante ressaltar que todos os animais deste grupo experimental morreram até o 22<sup>o</sup> dia de infecção.

No 30<sup>o</sup> dia após a inoculação (figura 18 D) foram observados níveis séricos de TNF- $\alpha$  maiores nos animais inoculados com TS em relação aos inoculados com TM, sendo esta diferença significativa entre os animais inoculados via oral. Entretanto, com exceção dos animais inoculados via cutânea, em todos os grupos de animais inoculados com TM, os níveis de TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores do que o dos animais CNI.

Os níveis séricos de IL-10 podem ser observados nas figuras 18 E e 18 F. Aos 15 dai pode-se observar que os níveis desta citocina foram significativamente maiores do que o detectado nos animais não infectados em todos os grupos experimentais, com exceção do oral/TS, CUT/TM e OCU/TM. De forma similar ao observado anteriormente, em relação às citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , apenas no grupo IP/S os níveis de IL-10 foram significativamente maiores do que o detectado nos animais do grupo IP/M, sendo a produção desta citocina nos animais inoculados com TS cerca de 5 vezes maior que nos inoculados com TM, levando em consideração a mesma via de inoculação. De forma interessante, foi observada uma redução dos níveis séricos de IL-10 na avaliação realizada 30 dias após a inoculação dos animais (figura 18F). Neste período apenas no grupo de animais infectados pela via oral com TS os

níveis desta citocina foram significativamente maiores do que o detectado nos animais não infectados.

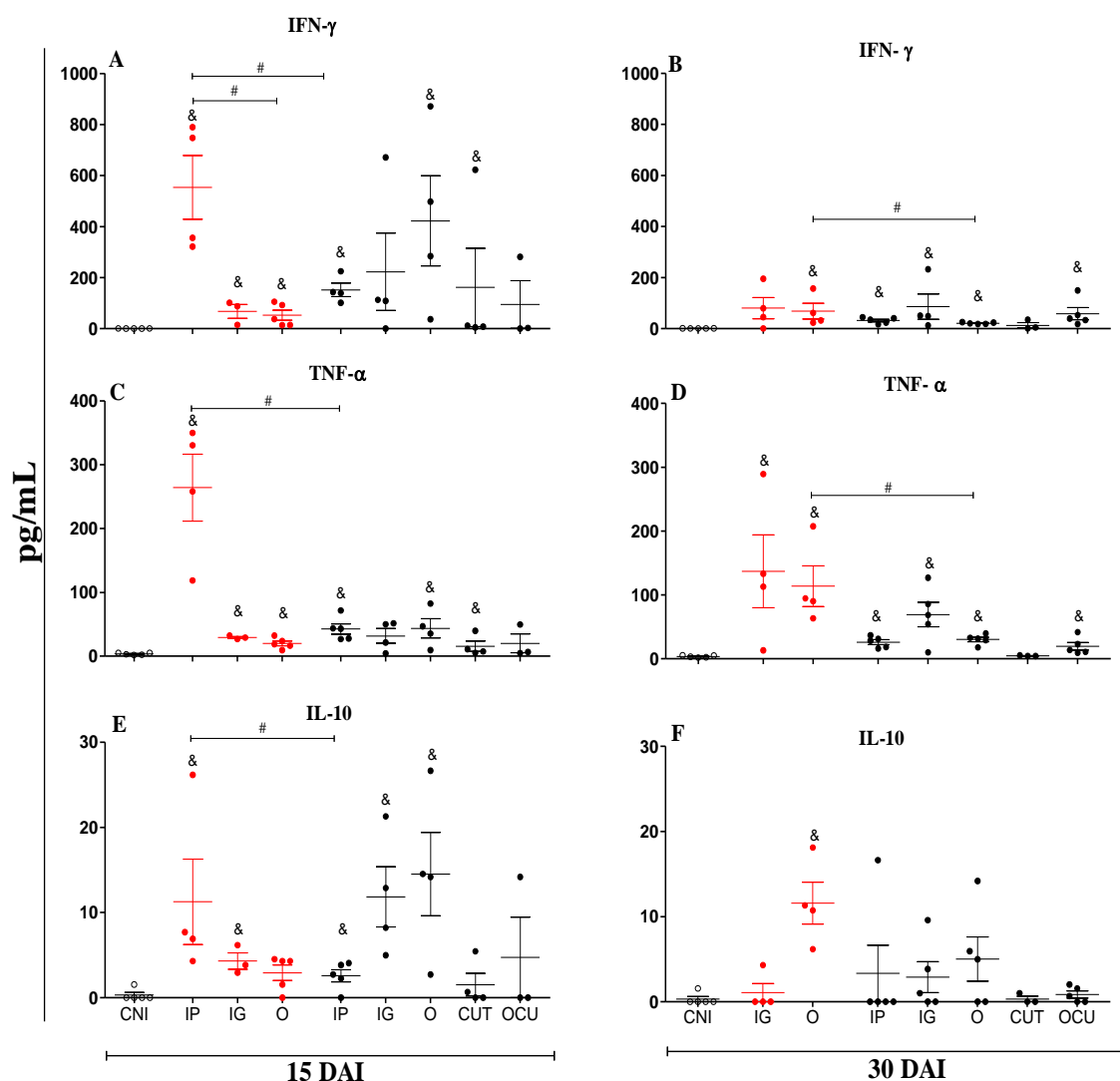


Figura 18: Níveis séricos de citocinas obtidos através de CBA em camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (dai) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. A e B níveis de IFN- $\gamma$ . C e D níveis de TNF- $\alpha$ . E e F níveis de IL-10. &: significa diferença em relação ao grupo CNI ( $p < 0,05$ ). #: significa diferença entre os animais inoculados pela mesma via quando se altera a origem do tripomastigota ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.7 Detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos animais

Os níveis de anticorpos da classe IgM, IgG e das subclasses IgG2a e IgG2b detectados no soro dos animais infectados por TS e por TM pelas diferentes vias de inoculação estão apresentados na figura 19.



Na análise da classe IgM (figura 19A) pode-se observar que dentre os animais inoculados por TS, os infectados pela via IP apresentaram maior produção de IgM que os animais inoculados pelas outras vias analisadas, sendo estatisticamente diferente do grupo infectado pela via oral. Os animais infectados pela via oral apresentaram níveis séricos semelhantes aos animais do CNI. Dentre os animais infectados por TM não foram observadas diferenças entre as vias de inoculação, porém os animais infectados pelas vias IG e ocular apresentaram níveis de IgM semelhantes aos animais do grupo controle não infectado. É importante salientar que os animais inoculados pela via IP/TS apresentaram maior produção de IgM em relação aos animais inoculados pela via IP/TM, enquanto os animais infectados via oral/TM apresentaram maior produção da mesma imunoglobulina em relação aos animais inoculados via oral/TS. Os níveis séricos de IgM permaneceram estáveis até 30 dai (figura 19B), não tendo sido observado, neste período, influência da origem do tripomastigota ou da via de inoculação nestes níveis.

Na figura 19C pode-se observar os níveis de IgG aos 15 dai. Entre o grupo de animais inoculados por TS esta imunoglobulina encontra-se em maiores níveis séricos naqueles infectados pela via oral, embora não sejam detectadas diferenças estatísticas em relação às outras vias de infecção. Nos animais infectados por TM é possível observar que nos animais inoculados via IP foram detectados os maiores níveis desta imunoglobulina. No entanto, os níveis de IgG foram menores nos soros dos animais inoculados por TM em relação aos inoculados com TS, independente da via de inoculação. É importante ressaltar que os níveis séricos de IgG nos animais inoculados pela via ocular foram semelhantes aos do CNI. Na figura 19D, observa-se que os níveis de IgG aos 30 dai, aumentaram em relação ao detectado aos 15 dai. Dentre os animais infectados por TS não houve diferença entre os grupos analisados. Entre os grupos de animais inoculados por TM os que foram inoculados pela via IP apresentaram maior nível sérico de IgG.

Os níveis séricos da imunoglobulina IgG2a estão apresentados nas figuras 19E e 19F. Aos 15 dai (figura 19E) os animais inoculados com TS apresentaram maiores níveis de IgG2a em relação aos animais inoculados com TM, não sendo detectada diferença entre os grupos infectados pelos tripomastigotas de mesma origem. É importante ressaltar que apenas os animais inoculados pela via IP não apresentaram diferença estatística quando se alterou a origem do tripomastigota. Na figura 19F (30 dai), novamente, pode ser observado que o nível desta imunoglobulina aumentou em relação aos 15 dai. Os animais infectados pelas vias IG e oral, quando infectadas por TS, apresentaram níveis mais elevados do que quando infectadas

por TM. Embora os grupos de animais inoculados com TM apresentem menores níveis de IgG2a, os animais infectados por todas as vias foram estatisticamente maiores quando comparados aos CNI.

De forma diferente, os níveis da IgG2b aos 15 dias (figura 19E) foram semelhantes entre os animais inoculados pelas diferentes vias e origens dos tripomastigotas. Somente o grupo infectado pela via IG /TS apresentou níveis séricos de IgG2b maior em relação aos animais inoculados pela mesma via inoculada por TM. Na figura 17 F, também, é possível observar níveis mais elevados desta imunoglobulina em todos os grupos de animais infectados em relação aos animais não infectados, não sendo detectadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

De forma geral, não foi observada diferença marcante nos níveis séricos de IgM, IgG, IgG2b em relação à origem do tripomastigota e a via de inoculação utilizados para a inoculação dos animais, com exceção da imunoglobulina IgG2a. Os níveis séricos de IgG2a foram maiores nos animais inoculados com TS, considerando a mesma via de inoculação.

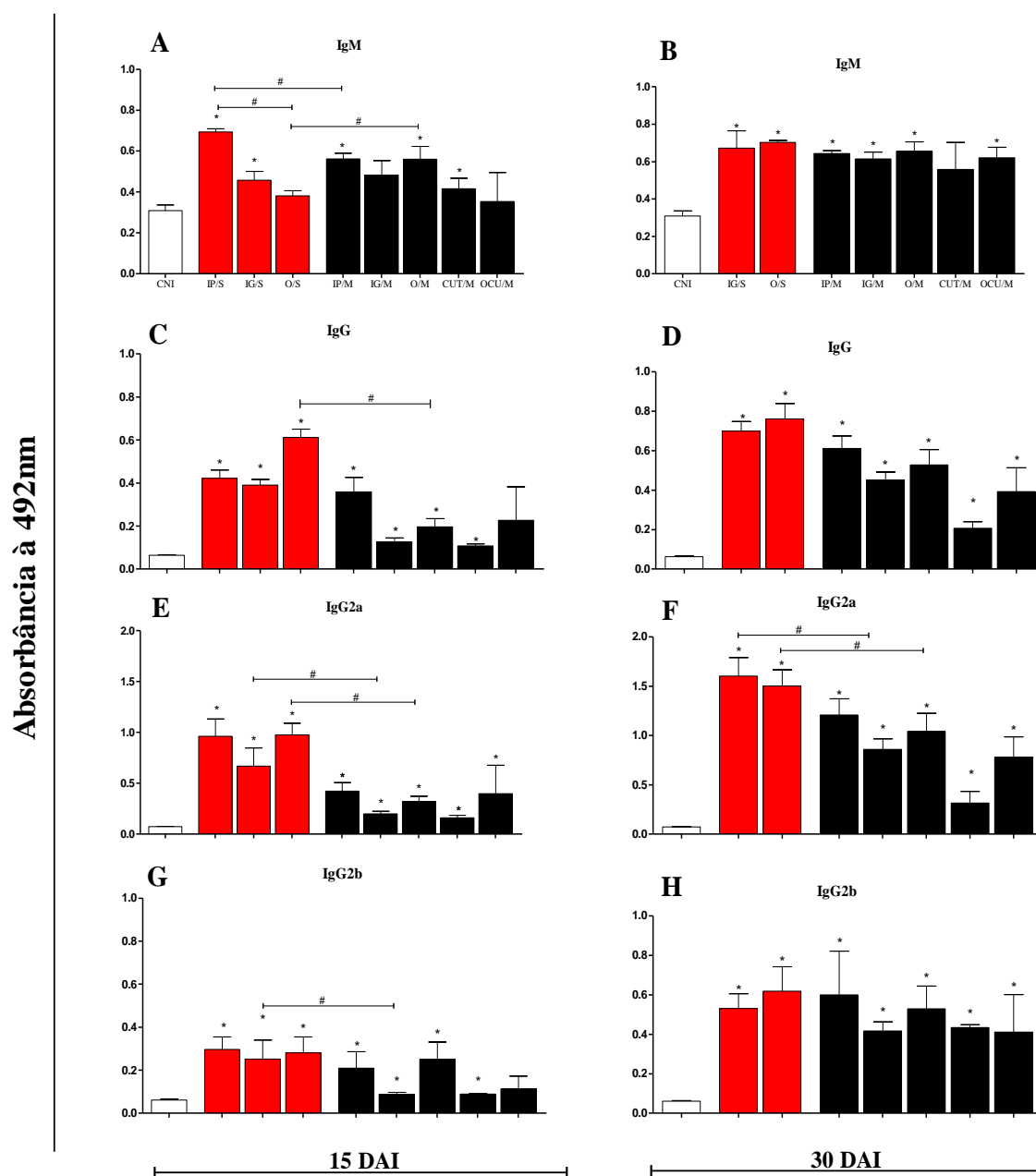


Figura 19: Absorbância média de imunoglobulinas determinadas através de ELISA nos soros de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (vermelho) ou metacíclicos (preto) da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* avaliados aos 15 e 30 dias após a infecção (dai) pelas vias: intraperitoneal (IP), intragástrica (IG), oral (O), cutânea (CUT) e ocular (OCU). CNI: controle não infectado. A e B imunoglobulina da classe IgG. B e C imunoglobulina da classe IgG2a. D e F imunoglobulina da classe IgG2b. G e H imunoglobulina da classe IgM. \*: significa diferença em relação ao grupo CNI ( $p < 0,05$ ). #: significa diferença entre os animais inoculados pela mesma via quando se altera a origem do tripomastigota ( $p < 0,05$ ).

## 6 - DISCUSSÃO

Uma das características mais intrigantes da doença de Chagas é o seu amplo espectro de manifestações clínicas, que pode ser observada em ambas as fases da infecção, aguda e crônica. Os mecanismos envolvidos na patogênese da doença de Chagas não estão, ainda, completamente compreendidos, mas certamente fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro são importantes na evolução desta parasitose.

A via de inoculação tem sido relacionada como um fator importante na evolução da infecção do hospedeiro vertebrado (CAMANDARоба; PINHEIRO LIMA; ANDRADE, 2002; DIAS et al., 2013). Em humanos, diferentes estudos mostraram que a doença de Chagas, transmitida por via oral, apresenta características clínicas peculiares em relação à transmitida por via vetorial, podendo ainda, apresentar diferenças entre as regiões de um mesmo país (DIAS, 2006b; PINTO et al., 2008; OPAS, 2009; DE NOYA et al., 2010; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). A principal diferença observada nas descrições clínicas em casos de infecção aguda provenientes de áreas endêmicas com transmissão vetorial e daquelas com transmissão oral (Região Amazônica), é a elevada morbidade. Sintomas mais graves nas infecções pela via oral poderiam ser relacionados ao tamanho do inóculo e ao mecanismo eficiente de infecção através da mucosa do estômago (DIAS, 2006b; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

Independentemente do mecanismo de transmissão, a interação hospedeiro-parasito se inicia com o contato dos TS ou TM com a célula hospedeira. Aparentemente, apenas estas formas possuem moléculas necessárias para a interação e/ou invasão das células do hospedeiro vertebrado (RAMIREZ et al., 1993). As formas tripomastigotas expressam uma grande variedade de proteínas e glicoconjugados na sua superfície celular que estão envolvidas em dois aspectos fundamentais da interação parasito-hospedeiro, a invasão celular e a evasão da resposta imune do hospedeiro (YOSHIDA, 2006; ALVES; COLLI, 2008).

Neste trabalho foi utilizada a cepa Colombiana, pelo fato de pertencer a DTU I (observada em um grande número de casos de infecção oral humana) e por apresentar características biológicas (infectividade, mortalidade, patogenicidade e tropismo tecidual) bem definidas em camundongos (ANDRADE et al., 1985).

Inicialmente, foi avaliada a influência do tempo de manutenção do parasito em meio de cultura acelular na infectividade e na virulência de TM da cepa Colombiana para camundongos. Para a obtenção dos TM foram utilizadas culturas em meio LIT de parasitos recém-isolados de camundongos e parasitos mantidos por mais de 1 ano através de repiques

sucessivos em meio de cultura. A infectividade, avaliada pelo exame de sangue a fresco e qPCR, não foi marcadamente influenciada pelo tempo de manutenção do parasito em meio de cultura. Por outro lado, pode-se detectar uma redução na virulência do parasito mantido por longo período em meio de cultura, avaliada pelos níveis de parasitemia, que foi subpatente ou em baixos níveis nos animais inoculados pelas vias IP, oral ou IG. Nos animais inoculados com parasitos recém-isolados de camundongos o parasito foi detectado em 100% dos animais por exame de sangue a fresco, independente da via de inoculação, sendo os níveis de parasitemia 7 a 10 vezes maiores em relação ao detectado nos animais inoculados com parasitos mantidos por longo período em cultura.

Barbosa (1988) observou que a cepa Y, mantida por 20 anos em meio de cultura (LIT) através de repiques quinzenais, perdeu totalmente a capacidade de infectar camundongos (BALB/C), mesmo após a inoculação intraperitoneal de números elevados de tripomastigotas oriundos de cultura. Contreras, Araque e Delgado (1994) observaram que TM obtidos de parasitos mantidos exclusivamente em meios de cultura foram menos infectivos, induziram parasitemia subpatente e foram menos letais para camundongos quando comparados a infecções induzidas por parasitos mantidos em passagens sucessivas em animais.

A influência variável do tempo de manutenção do *T. cruzi* em meio de cultura na sua infectividade para camundongos poderia ser explicada pelas diferentes metodologias utilizadas na avaliação da infectividade, ou seja, exame de sangue a fresco e qPCR (no presente estudo), exame de sangue a fresco (BARBOSA, 1988), exame de sangue a fresco, xenodiagnóstico e hemocultura (CONTRERAS; ARAQUE; DELGADO, 1994). No entanto, todos os estudos citados mostraram que o tempo de manutenção do parasito, em meio de cultura, influencia o nível de parasitemia observado nos camundongos. Dois principais mecanismos vêm sendo propostos, para explicar a influencia do tempo de manutenção dos parasitos em cultura, em relação a sua capacidade infectiva. O primeiro sugere que repiques sucessivos em meio de cultura poderia selecionar subpopulações menos virulentas de cepas de *T. cruzi* geneticamente heterogêneas. O segundo mecanismo, sugere que as alterações na virulência poderiam ser devido a modificações pós-traducionais pela ausência da alternância natural de hospedeiros (vertebrado-invertebrado) no ciclo de vida do parasito (CONTRERAS; DE LIMA; ZORRILLA, 1998). Neste contexto, todos os experimentos deste estudo foram realizados utilizando parasitos recém-isolados de camundongos.

Dessa forma, no presente estudo, camundongos BALB/c foram infectados por TS ou TM pelas vias intraperitoneal, intragástrica e oral. Adicionalmente, na tentativa de mimetizar

a infecção natural, camundongos BALB/c foram inoculados, também, pelas vias cutânea e ocular com TM.

Não foi observada diferença marcante no índice de infecção entre os animais inoculados com formas TM ou TS pelas vias IP, oral ou intragástrica, tendo sido observado 70 a 100% de infecção entre os animais inoculados com TS e 100% naqueles inoculados com TM. De forma diferente, tanto o perfil de curva de parasitemia, quanto os níveis de parasitemia foram influenciados pela origem do tripomastigota e pela via de inoculação.

Nos animais inoculados com TS o período pré-patente foi menor entre os animais inoculados via IP (2 dias) em relação aos inoculados via oral ou IG (11 dias), no entanto, foi observado o mesmo perfil de curva de parasitemia, com níveis ascendentes e sem pico de parasitemia definido. Além disso, foi detectado 100% de mortalidade nos animais inoculados via IP até o 22<sup>o</sup> dia de infecção, enquanto os animais inoculados via oral e IG sobreviveram até o 30 dia de infecção, quando foram eutanasiados.

Nos animais inoculados com TM foi detectado período pré-patente semelhante (8,8 a 9,6 dias) entre os animais inoculados pelas vias IP, oral e IG. Por outro lado nos animais inoculados via ocular o período pré-patente foi de 17 dias e naqueles que receberam o parasito via cutânea a parasitemia foi subpatente em todos os animais. Adicionalmente o período de patência da parasitemia foi sempre maior entre os animais inoculados com TS, em relação aos inoculados com TM, independente da via de inoculação. Não foi possível observar um perfil definido de curva de parasitemia nos grupos inoculados por TM. O parasito foi detectado em níveis baixos e de forma irregular, independente da via de inoculação, sendo os maiores níveis de parasitemia detectados nos animais infectados pelas vias IP, oral e IG, em relação aos inoculados via ocular e cutânea.

Estes resultados mostram a influência da via de inoculação, tanto nos níveis de parasitemia, quanto na taxa de mortalidade de camundongos infectados pela cepa Colombiana. Estes resultados estão de acordo com Dias et al. (2013), que verificaram a ocorrência de maiores níveis de parasitemia e mortalidade entre camundongos Swiss inoculados com TS da cepa Colombiana pela via IP em relação aos animais que receberam o parasito pela via IG.

Embora as formas TS e TM possam infectar a célula hospedeira de forma efetiva, elas apresentam moléculas de superfície distintas que poderiam resultar em diferentes interações parasito/célula. De fato, diferentes estudos mostram que após os TS serem liberados das células de mamíferos uma remodelação da superfície do parasito ocorre, o que leva a um

aumento em sua capacidade de infectar novas células (BURLEIGH E ANDREWS, 1995). Neste estudo foram observados perfis de curvas de parasitemia, níveis de parasitos circulantes e mortalidade diferentes quando foram utilizados TS ou TM para a infecção dos animais. Perfil semelhante foi observado por Bahia et al (2002) e Carneiro et al. (2007) na infecção de cães pela cepa Berenice-78 e por Vieira et al. (2012) em camundongos inoculados com a mesma cepa. Portanto, além da via de inoculação, a origem do tripomastigota envolvido na infecção mostra-se importante na evolução da fase aguda da doença de Chagas.

De acordo com diferentes autores as formas TM e TS utilizam mecanismos diversos na interação com a célula hospedeira, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a influência da origem do tripomastigota na evolução da fase aguda da infecção. De acordo com YOSHIDA (2016) as formas TS e TM utilizam diferentes mecanismos para penetrar na célula hospedeira, sendo que a invasão de MT é principalmente dependente de lisossoma, enquanto a entrada de TCT é predominantemente independente de lisossoma. No entanto, não é possível explicar um mecanismo complexo por apenas um dos fatores relacionados no processo de interação parasito/célula, no qual estão envolvidas um grande número de moléculas, tanto do hospedeiro vertebrados quanto do parasito (BURLEIGH E ANDREWS, 1995). Além disso, o *T. cruzi* pode penetrar e multiplicar em muitos tipos celulares, que possuem diferentes receptores, dificultando o entendimento dos mecanismos de interação parasito/hospedeiro.

Outro objetivo deste estudo foi verificar a distribuição tecidual do *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção (15 e 30 dias após a inoculação). Nos animais inoculados com TS via IP o DNA do *T. cruzi* foi detectado em 100% dos animais com uma ampla distribuição tecidual, tendo sido detectado na bochecha/língua, trato gastrointestinal, baço, fígado, músculo esquelético e coração. Nestes animais o parasito não foi detectado apenas no cérebro na avaliação realizada em tecidos coletados aos 15 dai. Distribuição tecidual semelhante foi verificada nos animais inoculados com TM via IP, com a diferença que nestes animais o DNA do parasito foi detectado também nas amostras coletadas do cérebro (40%). Neste período o parasitismo tecidual foi sempre mais intenso nos animais inoculados com TM. Este resultado é interessante, pois o parasitismo sanguíneo foi significativamente maior nos animais inoculados por TS, sendo que nestes foi observado 100% de mortalidade, enquanto os inoculados com TM sobreviveram até o 30<sup>o</sup> dia de infecção.

De forma diferente, a distribuição tecidual observada nos animais inoculados pelas vias oral e IG foi marcadamente influenciada pela origem do tripomastigota. Nos animais inoculados com TS o parasito foi detectado em 100% dos animais apenas no tecido muscular

cardíaco no 15<sup>o</sup> e no 30<sup>o</sup> dia de infecção e no músculo esquelético dos animais inoculados via oral no 30<sup>o</sup> dia de infecção. Nos outros tecidos avaliados o DNA do parasito não foi detectado ou foi detectado em um pequeno número de amostras. De forma diferente, nos animais inoculados com TM pelas vias IG e oral foi detectada uma ampla distribuição tecidual, sem aparente sede de predileção. Deve-se ressaltar que o DNA do parasito foi detectado em 80 a 100% das amostras de cérebro, baço, fígado, coração e trato gastrointestinal (com exceção do fígado nos animais inoculados via oral aos 30 dias de infecção) dos animais inoculados com TM. Entre os animais inoculados com TM pela via ocular esta ampla distribuição tecidual foi observada apenas aos 30 dai, enquanto nos animais inoculados via cutânea sempre foi observado baixo parasitismo tecidual.

De forma geral, os resultados deste estudo mostraram que nos animais infectados por TS, via oral e IG, foi detectado nítido tropismo do parasito para o coração e ME. Nos animais inoculados via IP o parasito foi detectado na maioria dos tecidos analisados e com maior intensidade. Camandaroba, Pinheiro-Lima e Andrade (2002) também observaram parasitemia e parasitismo maiores na infecção pela via IP, quando comparada a via IG, em camundongos Swiss infectados pelas formas TS da cepa Colombiana. De acordo estes autores, o parasitismo tecidual (coração e músculo esquelético) foi mais evidente e intenso nos animais inoculados via IG aos 30 dai, enquanto nos animais inoculados via IP o parasitismo nestes tecidos foi mais intenso aos 15 dai. Estes resultados estão de acordo com os observados no atual estudo em relação aos animais inoculados via IG.

Em contrapartida, Barreto-de- Albuquerque et al. (2015), em infecção de camundongos BALB/c com tripomastigotas derivados de cultura de tecido da cepa Tulahuen (Tc VI), observaram maior parasitismo cardíaco, avaliado por histopatologia, nos animais infectados pela via IG aos 15 dai quando comparada aos infectados via oral. A análise da carga parasitária tecidual, utilizando a qPCR, realizada neste estudo, revelou um maior parasitismo cardíaco nos animais infectados pelas vias IG e oral por TS apenas aos 30 dias após a infecção. Nos outros tecidos analisados: baço, fígado bochecha, língua, estômago, jejuno, cólon e cérebro o parasito foi detectado em baixa frequência e em baixos níveis.

As diferenças na frequência do parasitismo tecidual e na intensidade do parasitismo sanguíneo e tecidual observadas nos animais inoculados pelas vias IP e IG/oral poderiam ser explicadas pela ausência da gp82 nos TS, pois esta molécula é considerada essencial no estabelecimento da infecção pela via oral (CORTEZ et al., 2003; NEIRA et al., 2003). A gp82 tem a habilidade de se ligar a mucina gástrica e auxiliar na entrada dos parasitos pela mucosa



gástrica (NEIRA et al., 2003). Sendo assim pode-se inferir que os parasitos inoculados pela via IP interagiriam rapidamente com os macrófagos intraperitoneais, multiplicando e invadindo novas células e assim propagando a infecção rapidamente no organismo do hospedeiro. Enquanto os parasitos (TS) inoculados pelas vias oral e IG encontrariam no estômago um pH muito ácido (que pode ter levado a morte uma parte dos parasitos) e também enfrentariam maior dificuldade em vencer a barreira da mucina gástrica, já que não possuem a glicoproteína gp82 em sua membrana. Apesar disso, deve ser ressaltado que o TS tem habilidade em invadir as células hospedeiras, quando administrado via oral e IG, por mecanismos independentes da gp82, pois 77 a 100% dos animais inoculados por estas vias foram infectados.

Entre os grupos de animais infectados por TM, foi observado um maior nível de parasitismo sanguíneo e tecidual nos animais inoculados via oral e IG quando comparado às outras vias de inoculação. Este resultado poderia estar relacionado à presença da gp82 nas formas TM. Esta molécula estaria relacionada à alta resistência do TM a proteólise (MORTARA et al., 1992), e com a sua capacidade de se ligar a mucina gástrica. Estas características facilitariam a sua resistência às condições adversas do meio gástrico e a sua migração, de forma mais eficiente, para as células alvo na mucosa gástrica (YOSHIDA, 2006).

É importante ressaltar que a distribuição do parasito nos tecidos ocorreu mais tardiamente nos animais infectados com TM via ocular, uma vez que o parasito foi detectado nos tecidos de apenas 25% (1/4) dos animais 15 dias após a infecção e em 100% (4/4) daqueles eutanasiados 30 dias após a infecção. Interessantemente, os resultados deste estudo mostram uma maior multiplicação do parasito no cérebro nas infecções por TM, quando comparado a TS. Adicionalmente, nos animais inoculados com TM foi observada maior carga parasitária no cérebro dos animais inoculados pelas vias oral e IG em relação aos animais inoculados via IP, cutânea e ocular. De forma diferente o parasito não foi detectado no cérebro dos animais inoculados com TS via IP e em apenas em 20 a 30% dos inoculados via oral e IG. De forma interessante, pode-se observar que o índice de infecção, os níveis de parasitemia e a intensidade do parasitismo tecidual sempre foram menores nos animais infectados via cutânea.

Outro ponto interessante observado neste estudo foi o intenso parasitismo detectado na bochecha e língua nas infecções pelas vias IG e oral com TM. Estes resultados sugerem que além da mucosa gástrica o parasito pode penetrar também pela mucosa oral. De forma

diferente, Hoft (1996) sugeriu que na infecção de camundongos pela via oral com TM a mucosa gástrica seria a principal porta de entrada dos parasitos. Os diferentes resultados, entres os dois estudos, poderiam ser explicados, pelo menos parcialmente, pelas metodologias utilizados na detecção do parasito, ou seja, cortes histológicos corados pela técnica de imunohistoquímica (HOFT, 1996) ou por qPCR (no presente estudo). Os resultados do presente estudo estão em linha com outros autores, que utilizando os métodos de bioluminescência e qPCR observaram que as principais regiões afetadas na infecção oral foram os tecidos da cavidade oral e adjacências e não o estômago (SILVA-DOS-SANTOS et al., 2017). Desta foram, fica evidente que a cavidade oral é uma importante porta de entrada das formas TM, explicando assim as diferenças observadas na distribuição e na intensidade do parasitismo tecidual observados entre as infecções por via oral ou IG.

Em conjunto, os resultados deste estudo mostraram diferenças marcantes entre as infecções por TS e TM, independente da via de inoculação. A infecção por TS induz alta parasitemia, menor período pré-patente, maior período de patência da parasitemia e menor parasitismo tecidual (nas amostras analisadas) em relação à infecção por TM. Uma possível explicação para estas diferenças poderia ser relacionada às moléculas expressas na superfície das formas TS. As glicoproteínas Tc-85, observadas na membrana de TS, se ligam a laminina e fibronectina o que permite a sua interação com uma vasta variedade de células alvo que apresentem receptores para essas moléculas. Esta ligação permite uma rápida interação parasito-célula hospedeira, e conseqüentemente, favorecendo uma dinâmica penetração, multiplicação e liberação do parasito na circulação sanguínea do hospedeiro (YOSHIDA, 2006). Enquanto as formas TM, que estimulam menos a resposta imune inata (CAMARGO et al., 1997a), infectariam as células hospedeira de forma mais silenciosa, o que favoreceria a sua permanência nos tecidos do hospedeiro. Esta hipótese é corroborada por outros autores que demonstraram um maior parasitismo sanguíneo em animais infectados com TS em relação aos infectados com a TM de diferentes populações do parasito, como as cepas Tulahuén, Y, M-1 e Berenice-78 (MCHARDY; NEAL, 1979; VIEIRA et al., 2012; DIAS et al., 2013).

De forma geral, a fase aguda da doença de Chagas é marcada por alto parasitismo sanguíneo e tecidual e este perfil parece desempenhar papel importante na gênese da resposta inflamatória (COURA, 2007). O coração é o órgão mais frequentemente afetado durante esta fase da infecção, no entanto outros órgãos também são acometidos, como o fígado e o baço (RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012). No presente estudo o fígado e o baço foram os órgãos

mais intensamente parasitados quando os animais foram inoculados por TM, enquanto nos animais inoculados com TS o parasitismo mais intenso foi detectado no tecido muscular cardíaco.

Apesar do intenso parasitismo hepático entre os animais infectados por TM aos 15 dias do processo inflamatório, ora focal ou multifocal, sempre foi discreto. Entretanto, nos animais com parasitismo hepático discreto ou ausente, como os inoculados com TM (vias cutânea e ocular) e com TS (vias IP, oral e IG) o aspecto histológico geral do tecido hepático foi normal. Um perfil diferente foi observado aos 30 dias, neste período as alterações histológicas no fígado foram mais frequentemente detectadas, independentemente da presença do parasito neste órgão, exceto nos animais do grupo infectado pela via cutânea.

De forma diferente, no baço foi detectada a presença de nódulos reativos em todos os grupos de animais infectados nos dois períodos avaliados. Apesar do intenso parasitismo encontrado nos animais inoculados com TM (vias IP, IG e oral) não foi observada diferença, em relação aos animais infectados por TS, na intensidade da hiperplasia de polpa branca no baço. Aos 30 dias foi detectada discreta hiperplasia de polpa branca nos animais infectados por TS e por TM, independente da via de inoculação. Entretanto, a análise da área média dos folículos linfóides foi influenciada pela origem do tripomastigota utilizado na infecção, sendo que os animais inoculados por TS (vias IG e oral) apresentaram maior área de folículos linfóides quando comparados aos animais inoculados por TM. Estes resultados sugerem que os níveis de parasitismo no baço não estariam diretamente relacionados com a intensidade da hiperplasia da polpa branca. Estes resultados podem estar relacionados com a capacidade dos TS, mas não dos TM, em ativar células do sistema fagocitário mononuclear (CAMARGO et al., 1997a).

Os resultados deste estudo demonstraram que o músculo cardíaco foi o tecido mais intensamente parasitado nos animais infectados por TS, entretanto, o parasitismo cardíaco destes animais foi inferior ao detectado nos animais infectados por TM. A análise histológica deste tecido demonstrou miocardite moderada nos animais infectados por TS, independente da via de inoculação aos 30 dias após infecção. Já nos animais inoculados por TM, a miocardite foi discreta em todos os grupos experimentais, exceto o grupo de animais infectados pela via cutânea. Nestes animais não foi observada alteração neste tecido.

De forma semelhante, Rodrigues et al (2016) demonstraram inflamação no baço e coração de camundongos C57BL/6 infectados com TM das cepas G ou CL pela via oral, mesmo na ausência de parasitismo, avaliado por qPCR, no baço e detectado em baixos níveis

no coração. De forma interessante, os autores observaram que o parasitismo foi mais intenso no estômago, o qual também apresentou menor inflamação nos períodos analisados (3 horas, 5 e 15 dias e 3 e 6 meses).

A análise de outros tecidos demonstrou pouca ou nenhuma alteração histológica no cérebro, língua, bochecha, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e músculo esquelético aos 15 dai. Na avaliação realizada no ME aos 30 dai observou-se processo inflamatório mais frequente, com intensidade moderada a intensa nos animais inoculados por TS independente da via de inoculação. Nos animais infectados com TM, pelas diferentes vias, foi detectada inflamação discreta, exceto os animais inoculados pela via cutânea que apresentaram tecidos histologicamente normais. Novamente, não foi possível observar correlação entre as alterações histopatológicas e a intensidade do parasitismo.

Outro aspecto importante observado no presente estudo foi o aumento do peso do baço nos animais experimentalmente infectados por *T. cruzi*. Como maior unidade do sistema mononuclear fagocitário (SMF), o baço é envolvido em todas as inflamações sistêmicas, sendo comum a detecção de esplenomegalia (FRANCO et al., 1994; COTRAN et al., 1996). No entanto, a presença de esplenomegalia, detectada na fase aguda da infecção, não foi relacionada aos níveis de parasitemia (PEREIRA et al., 1999). Nesta linha, diferentes estudos demonstraram que apesar do baço estar envolvido diretamente na produção de anticorpos durante a fase aguda, o aumento do volume deste órgão não estaria diretamente relacionado com a evolução da infecção de camundongos por *T. cruzi* (KRETLI; BRENNER, 1978). No presente estudo, os animais inoculados pela via IP com TS apresentaram intensa esplenomegalia, sendo o baço destes animais cerca de nove vezes maior do que o baço dos animais não infectados. O aumento do baço durante a infecção aguda por *T. cruzi* pode ser, em parte, explicado pela sua alta reatividade, que pode ser comprovada pela hiperplasia dos centros germinativos, proliferação de linfócitos, produção de anticorpos e expansão dos folículos linfóides (ALCÂNTARA FILHO; KRETLI; BRENNER, 1978; ANDRADE, 1985; CORDEIRO; DAHIA; ANDRADE, 1987; CAMARGO et al., 1991). Esses dados corroboram com os achados do presente estudo, uma vez que os animais que apresentaram a maior média de peso do baço (grupo infectado via IP/TS) também foram os que apresentaram níveis maiores das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, hiperplasia dos folículos linfóides e dos níveis séricos de IgM (comparado ao grupo não infectado). Aos 30 dai, embora observado um discreto aumento do baço nos grupos infectados por TM, aumento mais expressivo foi observado nos animais inoculados por TS. O aumento do volume do baço está associado a

maior área média dos folículos linfóides detectados nestes mesmos grupos experimentais. De forma diferente, a infecção por *T. cruzi* não induziu alteração significativa no volume do fígado.

As citocinas têm papel importante no controle da replicação do parasito e no perfil de resposta imune em animais infectados por *T. cruzi*. Na doença de Chagas, citocinas inflamatórias são essenciais para o controle do parasitismo durante a fase aguda da infecção (RIBEIRÃO et al., 2000; ABEL et al., 2001; FERREIRA et al., 2003). Na maioria dos casos, a intensa produção de citocinas inflamatórias está associada com o controle na reprodução do parasito, podendo estar associada à patogênese por induzir uma reação inflamatória exuberante (JUNQUEIRA et al., 2010). A alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  tem sido associada à severidade da progressão de danos cardíacos (GOMES et al., 2003; TALVANI et al., 2004). Já indivíduos assintomáticos apresentaram altos níveis da citocina IL-10 quando comparados com indivíduos com cardiopatia chagásica crônica (ARAÚJO et al., 2011) e também altas doses desta citocina já foram associadas a um melhor prognóstico da função cardíaca (COSTA et al., 2009).

No presente estudo, níveis maiores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram observados nos animais inoculados pela via IP com TS aos 15 dai, sendo que neste grupo de animais foi observado 100% de mortalidade até o 22<sup>o</sup> dia de infecção. Diversos autores tem relacionado o aumento de IFN- $\gamma$  com a mortalidade de animais experimentalmente infectados por *T. cruzi*, pois esta citocina atua na ativação de macrófagos e conseqüentemente aumentando a produção de derivados de oxigênio, os quais são tóxicos ao parasito e, em altas concentrações, aos tecidos do hospedeiro (SILVA et al., 1992; VESPA et al., 1994; SILVA et al., 1995; CARDILLO et al., 1996; HOLSCHER et al., 1998). Os animais inoculados com TM, pelas vias IG e OCU, apresentaram níveis séricos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  semelhantes aos dos animais não infectados aos 15 dai, enquanto todos os outros grupos de animais inoculados por outras vias, tanto com TS quanto com TM, apresentaram níveis séricos mais elevados desta citocina em relação aos animais não infectados. Aos 30 dai, pode-se observar a influência da origem do tripomastigota nos níveis das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos animais inoculados pela via oral, sendo os níveis séricos destas citocinas maiores nos animais inoculados com TS. Dentre os animais inoculados pelas outras vias, com TS ou TM, os níveis séricos destas citocinas foram semelhantes, mas sempre maiores do que o detectado nos animais não infectados. De forma interessante apenas nos animais inoculados com TM, via cutânea, os níveis séricos de todas as citocinas foram similares aos detectados nos animais não infectados. É importante lembrar

que nos animais inoculados via cutânea foram detectados baixos níveis de parasitismo, bem como pequenas alterações teciduais.

De forma geral, observa-se níveis séricos maiores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos animais inoculados pela via IP/TS que podem estar relacionada à sua rápida mortalidade. Nos animais inoculados com TS, aos 30 dai, foi observada uma elevação destas citocinas, o que poderia se relacionar com o maior parasitismo encontrado no coração no mesmo período. No entanto, não foram observadas alterações marcantes na avaliação histopatológica do tecido muscular cardíaco dos animais desses grupos. Estes resultados poderiam ser explicados pelo fato das formas TM não serem eficazes em desencadear a síntese de citocinas por macrófagos, enquanto que as formas TS são excelentes ativadoras dessas células levando a produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-12 (CAMARGO et al.,1997a). De acordo com estes autores a ativação de macrófagos e posterior produção de citocinas pró-inflamatórias estariam relacionadas às mucinas GPI-ancoradas presentes nas membranas de TS e ausentes em TM.

Na doença de Chagas a resposta imune humoral, associada à resposta celular, é importante no controle da infecção. Diversos autores têm demonstrado que a depleção de células B leva a um aumento da parasitemia na infecção experimental por *T. cruzi* (KUMAR; TARLETON, 1998). Para avaliar a influência da resposta humoral na evolução da infecção experimental induzida por TS e TM, inoculados por diferentes vias, foram avaliados os níveis séricos de IgM, IgG, IgG2a e Ig2b. Aos 15 dai, foram detectados níveis séricos mais altos de IgM nos animais inoculados com TS via IP. Aos 30 dai não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IgM entre diferentes grupos experimentais. A análise dos níveis séricos das imunoglobulinas IgG, IgG2a e IgG2b revelou níveis ascendentes entre as dosagens realizadas aos 15 e 30 dai. É importante salientar que não foi observada influência da via de inoculação nos níveis destas imunoglobulinas. Entretanto, foi detectado uma maior produção de IgG e IgG2a (pela via oral) e IgG2a e IgG2b (pela via IG) nos animais inoculados com TS, em relação aos que receberam TM aos 15 dai. Esta diferença persistiu até 30 dai apenas em relação IgG2a, que foi detectada em níveis mais elevados nos animais inoculados com TS.

Nesta linha, Coura-Vital et al. (2008) observaram, na infecção de cães com a cepa Berenice-78 com TS e TM pela via IP, que os níveis séricos de IgM eram maiores nos animais infectados com TS nas análises de 7, 14 e 28 dias após a infecção. Os resultados de Coura-Vital corrobora com os achados do presente estudo, uma vez que os animais infectados pela via IP com TS aos 15 dai apresentaram níveis de IgM maiores que os animais inoculados

com TM. Na análise de IgG os autores observaram níveis séricos elevados dos animais inoculados com TS aos 14 e 28 dai (COURA-VITAL et al., 2008).

De forma geral, os resultados deste estudo revelaram diferenças marcantes na evolução da infecção de camundongos BALB/c por TS ou TM da cepa Colombiana de *T. cruzi*. Os TS induziram uma infecção com alta parasitemia, maior processo inflamatório, resposta imune mais intensa, com nítido miotropismo. Foi detectada uma marcante influência da via de inoculação na virulência dos TS, sendo observados 100% de mortalidade nos animais infectados via IP, 10% nos inoculados pela via oral e 0% nos animais inoculados pela via IG. Estes resultados estão de acordo com a maior carga parasitária e maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (TNF-  $\alpha$  e IFN-  $\gamma$ ) detectados nos animais inoculados via IP em relação aos inoculados pelas vias oral e intragástrica.

De forma diferente nos animais inoculados com TM foram detectados menores níveis de parasitemia e de citocinas pró-inflamatórias (TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$  e IL-10) em relação aos inoculados com TS, considerando a mesma via de inoculação. Além disso, nos animais inoculados com TM não foi observado miotropismo, sendo o parasito detectado em todos os tecidos avaliados, sem sítio de predileção, e em maior intensidade em relação ao detectado nos animais que receberam TS.

A influência da via de inoculação na evolução da infecção dos animais também foi detectada nos animais inoculados com TM, especialmente relacionados aos níveis de parasitismo sanguíneo e tecidual, sendo estes níveis maiores entre os animais infectados pelas vias IG e oral em relação às vias IP, cutânea e ocular.

## 7- CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A manutenção do *T. cruzi* por longo período, através de passagens sucessivas em meio de cultura acelular, não alterou a infectividade da cepa Colombiana para camundongos BALB/c, mas significativamente reduziu a sua virulência, avaliada pelos níveis de parasitemia;
- Na infecção por tripomastigotas sanguíneos foi observado maior parasitismo sanguíneo, maior período de patência da parasitemia, mortalidade e um nítido miotropismo. Sendo que a inoculação via intraperitoneal induziu uma fase aguda mais severa em camundongos BALB/c em relação às inoculações via oral e intragástrica. Na infecção por tripomastigotas metacíclicos observou-se baixo parasitismo sanguíneo, menor período de parasitemia patente, nenhuma mortalidade e uma ampla distribuição tecidual, sem sede de predileção. Foi observado maior parasitismo sanguíneo e tecidual nos animais inoculados pelas vias oral e intragástrica em relação aos inoculados pelas vias intraperitoneal, ocular e cutânea.
- A intensidade da inflamação no coração, baço e fígado foi maior nos animais inoculados por tripomastigotas sanguíneos. Sendo maior aos 15 dai nos animais inoculados pela via IP e aos 30 dai nos animais inoculados pelas vias IG e oral.
- Nos tecidos analisados semi quantitativamente foi observado que, os animais inoculados por tripomastigotas sanguíneos apresentaram mais alterações patológicas e com maior intensidade aos 30 dai;
- O peso do baço apresentou-se maior nos animais inoculados por tripomastigotas sanguíneos tanto aos 15 quanto aos 30 dai. E não foram encontradas diferenças quanto ao peso do fígado;
- Na análise das quantidades séricas das citocinas foi observado que os animais inoculados pela via IP com tripomastigotas sanguíneos, apresentaram maiores níveis das citocinas avaliadas aos 15 dai. Já os animais inoculados pelos mesmos tripomastigotas, porém pelas vias IG e oral apresentaram maiores níveis aos 30 dai;
- Não foi possível observar uma coerência quanto às quantidades séricas das imunoglobulinas analisadas nos dois períodos avaliados.



## 8- REFERÊNCIAS

ABEL L.C, RIZZO L.V, IANNI B, ALBUQUERQUE F, BACAL F, et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity** 17: 99–107. 2001.

ALCÂNTARA FILHO A, KRETTLI A.U, BRENNER Z. Role the spleen in the experimental infection by *T. cruzi* in mice. In: **Anais da V Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas**, Caxambu, p. C-33, 1978.

ALMEIDA I.C, CAMARGO M.M, PROCÓPIO D.O, SILVA L.S, MEHLERT A, TRAVASSOS L.R, GAZZINELLI R,L, FERGUSON M.A.J. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO Journal**. 19(7): 1476-1485, 2000.

ALVES M.J, COLLI W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. **Subcellular Biochemistry** .47:58-69,2008.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de auerbach. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 219–224, 1966.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. Rev. **Instituto Medicina Tropical**, v. 10, p. 180–187, 1968.

ANDRADE Z.A. A patologia da doença de Chagas no homem. **Annales de La Societe Belge de Medecine Tropical** 65:15-30, 1985.

ANDRADE V, ANDRADE S.G, NETTO M.B, PONTES A.L, CASTRO R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 143–154, 1985.

ANDRADE, L. O, MACHADO C.R, CHIARI E, PENA S.D, MACEDO A.M *Trypanosoma cruzi*: Role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 4, p. 269–275, 2002.

ANDREWS N.W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biological Research** 26, 65±67.1993.

APARICIO I.M., SHARFSTEIN J., LIMA A.P. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. **Infection and Immunity**. 72(10):5892-902, out 2004.

ARAÚJO F.F, VITELLI-AVELAR D.M, TEIXEIRA-CARVALHO A, et al. Regulatory T cells pheno-type in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; 5: e992.9. 2011.

BARRETO-DE-ALBUQUERQUE J, SILVA-DOS-SANTOS D, PÉREZ A.R, BERBERT L.R, de SANTANA-VAN-VLIET E, FARIAS-DE-OLIVEIRA D.A, MOREIRA O.C, ROGGERO E, de CARVALHO-PINTO C.E, JURBERG J, COTTA-DE-ALMEIDA V, BOTTASSO O, SAVINO W, de MEIS J. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003849, 2015.

BASTOS, C. J. C, ARAS R, MOTA G, REIS F, DIAS J.P, de JESUS R.S, FREIRA M.S, de ARAÚJO E.G, PRAZERES J, GRASSI M.F. Clinical outcomes of thirteen patients with acute chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in Northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. 16–17, 2010.

BARBOSA, C. A. L. Estudo da Infectividade e Imunogenicidade da cepa "Y" de *T. cruzi*, mantida por longo período em meio de cultura. **Revista de Patologia Tropical**, 17(1): 25-39, 1988.

BENCHIMOL-BARBOSA, P. R. Predictors of mortality in Chagas' disease: the impact of atrial fibrillation and oral transmission on infected population. **International journal of cardiology**, v. 133, n. 2, p. 275–7, 3 abr. 2009.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. Livro *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. [s.l.] Guanabara Koogan, 1979.

BURLEIGH B.A, CALER E.V, WEBSTER P, ANDREWS N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. **The Journal of Cell Biology** 136: 609–620, 1997.

CAMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 97–103, abr. 2002.

CAMARGO, M. M, ALMEIDA I.C, PEREIRA M.E, FERGUSON M.A, TRAVASSOS L.R, GAZZINELLI R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 12, 1997a.

CAMARGO, M. M, ANDRADE A.C, ALMEIDA I.C, TRAVASSOS L.R, GAZZINELLI R.T. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma – primed macrophages. **The Journal of Immunology** 159: 6131-6139, 1997b.

CAMARGO I.J, ARAÚJO P.M, SAKURADA J.K, STACH-MACHADO D.R, RANGEL H.A. *Trypanosoma cruzi*: early resistance induced by culture-derived trypomastigotes. **Experimental Parasitology** 73:260-268, 1991.

CARADONNA, K.; PEREIRAPERRIN, M. Preferential brain homing following intranasal administration of *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1349–1356, 2009.

CARDILLO, F., VOLTARELLI, J.C., REED, S.G., Silva, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK Cells. **Infection and Immunity**, v.64, p.128-134, 1996.

CARNEIRO, C. M, MARTINS-FILHO O.A, REIS A.B, VELOSO V.M, ARAÚJO F.M, BAHIA M.T, de LANA M, MACHADO-COELHO G.L, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R, TAFURI W.L. Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **Acta Tropica**, v. 101, n. 101, p. 120–129, 2007.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

COLLINS M.H, CRAFT J.M, BUSTAMANTE J.M, TARLETON R.L. Oral exposure to *Trypanosoma cruzi* elicits a systemic CD8<sup>+</sup> T cell response and protection against heterotopic challenge. **Infection and immunity**, v. 79, n. 8, p. 3397–406, ago. 2011.

CONTRERAS V.T, ARAQUE W, DELGADO V.S. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis *in vitro*--I. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Apr-Jun;89(2):253-9.1994.

CONTRERAS, V.T.; DE LIMA, A.R.; ZORRILLA, G. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance in Culture Modify Gene and Antigenic Expression of Metacyclic Trypomastigotes. **Centro de Biología Molecular de Parásitos, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela**. Vol. 93(6): 753-760, 1998.

CORDEIRO S.M.S, DAHIA A.C.G, ANDRADE Z.A. Kinetics of *Trypanosoma cruzi* destruction in the mouse spleen. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 30:3-9, 1987.

CORTEZ M, NEIRA I, FERREIRA D, LUQUETTI A.O, RASSI A, et al. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule gp30. **Infection and Immunity** 71: 6184–6191,2003.

COSTA G.C, ROCHA M.O.C, MOREIRA P.R, et al. Functional IL-10 gene polymorphism is associated with Chagas disease cardiomyopathy. **The Journal of Infectious Disease** 199: 451–454. 2009.

COTRAN R.S, KUMAR V., ROBBINS S.L. Doenças dos leucócitos, linfonodos e baço. *In*: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (eds) Robbins Patologia Estrutural e Funcional. 5ª edição. **Editora Guanabara-Koogan**, Rio de Janeiro, p.557-597, 1996.

COURA, J. R. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39 Suppl 3, p. 113–7, 2006.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113–122, out. 2007.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 31–40, jul. 2009.

COURA-VITAL W., CARNEIRO C.M., MARTINS H.R., LANA M., VELOSO V.M, TEIXEIRA-CARVALHO A., BAHIA M.T., R. CORRÊA-OLIVEIRA, MARTINS-FILHO O.A., TAFURI W.L., REIS A.B. *Trypanosoma cruzi*: Immunoglobulin isotype profiles during the acute phase of canine experimental infection with metacyclic or blood trypomastigotes. **Experimental Parasitology** 120.269–274, 2008.

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53–59, 2003.

DE NOYA, B. A. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308–1315, 1 maio 2010.

DE DIEGO J., PUNZÓN C., DUARTE M., FRESNO M. Alteration of macrophage function by a *Trypanosoma cruzi* membrane mucin. **The Journal of Immunology**. 15;159(10):4983-9 Nov 1997.

DIAS, G. B. M. GRUENGLING A.P, ARAÚJO S.M, GOMES M.L, TOLEDO M.J. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 511–517, 2013.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 83–84, 2006a.

DIAS, J. C. P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de**

**Medicina Tropical**, 2006b.

DIAS, J. C. P. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 11–18, out. 2007.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015\* Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015 Antônio Carlos Silveira (in memoriam) Joffre Marcondes de Rezende (in memoriam). **Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília**, v. 25, p. 7–86, 2016.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 68–72, 2011.

EICKHOFF, C. S, DUNN B.A, SULLIVAN N.L, HOFT D.F. Comparison of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 508–511, 2013.

FEDERICI, E.; ABELMANN, W.; NEVA, F. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 272–280, 1964.

FERREIRA R.C, IANNI B.M, ABEL L.C, BUCK P, Mady C, et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/“indeterminate”and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98:407–411. 2003.

FILARDI, L.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* Strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

FRANCO M., SCHMITT F.C, BACCHI M.M, MARIGO C, PAES RP. Sistema hemolinfopoiético. In: Brasileiro Filho G, Pittella JEH, Pereira FEL, Bambilra EA, Barbosa AJA (eds) Bogliolo Patologia. 5ª edição. **Editores Guanabara-Koogan**, Rio de Janeiro, p.665-722, 1994.

GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. In: **Zoologia: guias e manuais de identificação**. 20. ed. Curitiba: **Sociedade Brasileira de Zoologia**. p. 261–265, 2014.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-g treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and transforming growth factor-b. **European Journal of Immunology**. v. 22, p.2501–2506, 1992.

GAZZINELLI R.T. Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases. **Trends in Molecular Medicine**, 2(6), 258-267, 1996.

GAZZINELLI, Z. B. E R. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy Immunology**, v. 114, p. 103–110, 1997.

GAZZINELLI R.T, AMICHAY D, SHARTON-KERSTEN T, GRUNWALD E, FARBER J.M, SHER A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. ;219:127-39. 1996.

GIORDANO R, CHAMMAS R, VEIGA S.S, COLLI W, ALVES M.J. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Molecular Biochemical Parasitology** 65: 85–94, 1994.

GIORGI M.E, LEDERKREMER R.M. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. **Carbohydrate Research** 346: 1389-1393, 2011.

GOMES J.A, BAHIA-OLIVEIRA L.M, ROCHA M.O, MARTINS-FILHO O.A, GAZZINELLI G, et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity** 71: 1185–1193.2003.

GONTIJO, E. D, ANDRADE G.M.Q, SANTOS S.E, GALVÃO M.L.C, MOREIRA E.F, PINTO F.S, DIAS J.C.P, JANUÁRIO J.N. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 18, n. 3, p. 243–254, 2009.

GRELLIER P, VENDEVILLE S, JOYEAU R, BASTOS I.M, DROBECQ H, FRAPPIER F, TEIXEIRA A.R, SCHRÉVEL J, DAVIOUD-CHARVET E, SERGHERAERT C, SANTANA J.M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **The Journal of Biological Chemistry** 276: 47078–47080, 2001.

GUEDES, P. M, VELOSO V.M, TAFURI W.L, GALVÃO L.M, CARNEIRO C.M, LANA M, CHIARI E, ATAÍDE SOARES K, BAHIA M.T. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. **Acta Tropica**, v. 84, n. 1, p. 9–17, 2002.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision. **Acta Tropica**, v. 119, p. 1–4, 2011.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. Interruption of Chagas Disease Transmission in the Andean

Countries: Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 94, p. 413–413, 1999.

GÜRTLER, R. E.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 29–32, jan. 2003.

HOFT, D. F. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 4, p. 360–4, out. 1996.

HOLSCGER, C., KOHLER, G., MULLER, U., MOSSMANN, H., SCHAUB, G., BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infection and Immunity**, v.66, p.1208-1215, 1998.

JUNQUEIRA C., CAETANO B., BARTHOLOMEU D.C., MELO M.B., ROPERT C., RODRIGUES M.M., and GAZZINELLI R.T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Cambridge University Press**. Vol. 12; e29. 2010.

KRETTLI A.V, BRENNER Z. Papel do baço na infecção experimental do camundongo com *T. cruzi*. In: **Anais da V Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas**, Caxambu, p. C-33. 1978.

KOEBERLE, F. Moléstia de Chagas. Enfermidade do sistema nervoso. Anais do Congresso Internacional de Doença de Chagas. **Anais**. 1961.

KUMAR S., TARLETON R.L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**. 20(5):207-16. May 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; NAIFF, R. D. Chagas' disease in the Amazon basin: speculations on transmission per os. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 22, n. 6, p. 294–7, 1980.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de chagas humana. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**, p. 486, 1997.

MAGDESIAN MH, GIORDANO R, ULRICH H, JULIANO M.A, JULIANO L, SCHUMACHER R.I, COLLI W, ALVAES M.J. Infection by *Trypanosoma cruzi*: identification of a parasite ligand and its hostcell receptor. **The Journal of Biological Chemistry**. 276: 19382–19389, 2001.

MARCILI A, VALENTE V.C, VALENTE S.A, JUNQUEIRA A.C, da SILVA F.M, PINTO

A.Y, NAIFF R.D, CAMPANER M, COURA J.R, CAMARGO E.P, MILES M.A, TEIXEIRA M.M. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius spp.* and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 615–623, 2009.

MARIN NETO, J. A.; SIMÕES, M. V; SARABANDA, A. V. Chagas' heart disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 72, n. 3, p. 247–80, mar. 1999.

MARQUES J, MENDOZA I, NOYA B, ACQUATELLA H, PALACIOS I, MARQUES-MEJIAS M. ECG manifestations of the biggest outbreak of Chagas disease due to oral infection in Latin-America. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 101, n. 3, p. 249–54, set. 2013.

MARSDEN, P. D. *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 61, n. 1, p. 62–67, 15 mar. 1967.

MILES M. A, CEDILLOS R.A, PÓVOA M.M, de SOUZA A.A, PRATA A, MACEDO V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8234, p. 1338–40, 20 jun. 1981.

MILES, M. A. et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1509, 20 out. 2009.

MONTEIRO, W. M, MAGALHÃES L.K, de SÁ A.R, GOMES M.L, TOLEDO M.J, BORGES L, PIRES I, GUERRA J.A, SILVEIRA H, BARBOSA MD. *Trypanosoma cruzi* IV Causing Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e41284, 25 jul. 2012.

MORTARA, R. A, da SILVA S, ARAGUTH M.F, BIANCO S.A, YOSHIDA N. Polymorphism of the 35-and 50-Kilodalton Surface Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 60, n. 11, p. 4673–4678, 1992.

NEIRA I, SILVA F.A, CORTEZ M, YOSHIDA N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infection and Immunity**. 71: 557–561, 2003.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi* : adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 26, 3 mar. 2009.

OPAS. GUIA PARA VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO, CONTROLE E MANEJO CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS. **Organização Pan-Americana da Saúde**, 2009.



OSTERMAYER, A. L, PASSOS A.D.C, SILVEIRA A.C, FERREIRA A.W, MACEDO V, PRATA A.R. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de Chagas no Brasil (2001-2008). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 108–121, 2011.

OUAISSI M.A, CORNETTE J AND CAPRON A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Molecular and Biochemical Parasitology** 19: 201–211, 1986.

PEREIRA, K. S, SCHMIDT F.L, GUARALDO A.M, FRANCO R.M, DIAS V.L, PASSOS L.A. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 441–446, 2009.

PEREIRA S.A.L, CORRÊA B.S, MINICICCI G.P, LOPES G.M.A, CASTRO E.C.C, REIS A, TEIXEIRA V.PA. Weight of the spleen in chronic chagasic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 32;2.Abril 1999.

PINAZO, M.J, MIRANDA B, RODRIGUÉZ-VILLAR C, ALTCLAS J, BRUNET SERRA M, GRACÍA-OTERO E.C, de ALMEIDA E.A, de la MATA GARCÍA M, GASCON J, GARCÍA RODRIGUEZ M, MANITO N, MORENO CAMACHO A, OPPENHEIMER F, PUENTE S, RIARTE A, SALAS CORONAS J, SALAVERT LLETI M, SANZ G.F, TORRICO F, TORRÚS TENDERO D, USSETTI P, SHIKANAI-YASUDA M.A. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. **Transplantation Reviews**, v. 25, n. 3, p. 91–101, jul. 2011.

PINTO, A. Y. D. N, VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C.; FERREIRA-JUNIOR, A. G.; COURA, J. R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602–614, 2008.

PINTO, A. Y. D. N HARADA G.S, VALENTE V.C, ABUD J.EA, GOMES F.S, SOUZA G.C.R, VALENTE S.A.S. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p. 413–419, out. 2001.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, set. 2001.

RAMIREZ, M. I, RUIZ R.C, ARAYA J.E, SILVEIRA A.F, YOSHIDA N. Involvement of the Stage-Specific 82-Kilodalton Adhesion Molecule of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes in Host Cell Invasion. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 61, n. 9, p. 3636–3641, 1993.

RASSI A, AMATO NETO V, RASSI G.G, AMATO V.S, RASSI JÚNIOR A, LUQUETTI A.O, RASSI S.G. Busca retrospectiva da transmissão materna da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 485–489, dez. 2004.

RASSI, A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clinical cardiology**, v. 23, n. 12, p. 883–9, dez. 2000.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9723, p. 1388–402, 17 abr. 2010.

RASSI JR.A, RASSI A., REZENDE J.M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**. 26.275–291. 2012.

RIBEIRÃO M, PEREIRA-CHIOCCOLA V.L, RENIA L, AUGUSTO FRAGATA FILHO A, SCHENKMAN S, et al. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. **Parasite Immunology**. 22: 49–53. 2000.

ROQUE A. L. R, XAVIER S.C, da ROCHA M.G, DUARTE A.C, D'ANDREAS P.S, JANSEN A.M. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 5, p. 742–9, nov. 2008.

RUIZ-SÁNCHEZ R, LEÓN M.P, MATTA V, REYES P.A, LÓPEZ R, JAY D, MONTEÓN V.M. *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 281, n. 1003, p. 281–281, 2005.

RUIZ R.C, FAVORETO S. Jr, DORTA M.L, OSHIRO M.E, FERREIRA A.T, MANQUE P.M, YOSHIDA N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signaling activity. **Biochemical Journal**. 330: 505–511, 1998.

SCHENKMAN S, JIANG M.S, HART G.W, NUSSENZWEIG V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell** 65: 1117–1125, 1991.

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

SCHOFIELD, C. J. Triatominae : biología y control. [s.l.] **Eurocommunica**, 1994.

SILVA, J.S., MORRISSEY, P.J., GRABSTEIN, K.H., MOHLERr, K.M., ANDERSON, D, REED, S.G . Interleukin 10 and interferon- $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Experimental Medicine**, v.175, p. 169-174, 1992.

SILVA J.S, VESPA G.N, CARDOSO M.A, ALIBERTI J.C, CUNHA F.Q. Tumour necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected  $\gamma$ -interferon-activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.63, p. 4862-4867, 1995.

SHIKANAI-YASUDA M. A, MARCONDES C.B, GUEDES L.A, SIQUEIRA G.S, BARONE A.A, DIAS J.C, AMATO NETO V, TOLEZANO J.E, PERES B.A, ARRUDA JÚNIOR E.R. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 5, p. 351–357, out. 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da Transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. suplemento II, p. 52–63, 2011.

STEINDEL, M; DIAS, JCP; ROMANHA, AJ . Doença de Chagas: Mal que ainda preocupa. **Revista Ciência Hoje**, vol. 37, nº 217, pág. 32 – 38, 2005.

STORDEUR P, POULIN L.F, CRACIUN L, ZHOU L, SCHANDENÉ L, de LAVAREILLE A, GORIELY S, GOLDMAN M. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **Journal of immunological methods**, v. 259, n. 1–2, p. 55–64, 1 jan. 2002.

TAFURI, W. L.; BRENER, Z. [Injuries of Meissner and Auerback plexus of albino mice intestines in the chornic phase of experimental trypanosomiasis cruzi]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 9, n. 3, p. 149–54, 1967.

TALVANI A, ROCHA MO, RIBEIRO AL, CORREA-OLIVEIRA R, TEIXEIRA MM. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **The Journal of Infectious Disease**. 189: 214–220. 2004.

TORRICO F, ALONSO-VEGA C, SUAREZ E, RODRIGUEZ P, TORRICO M.C, DRAMAIX M, TRUYENS C, CARLIER Y. 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.

TYLER K.M, ENGMAN D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal Parasitology** 1;31(5-6):472-81. May 2001.

VELOSO, V, CARNEIRO C.M, TOLEDO M.J, LANA M, CHIARI E, TAFURI W.L, BAHIA M.T. Variation in Susceptibility to Benznidazole in Isolates Derived from *Trypanosoma cruzi* Parental Strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 96, n. 7, p. 1005–1011, 2001.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. **Infection Immunity**, v.62, p. 5177-5182, 1994.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet 340. **World Health Organization**, 2017.

YEO M, ACOSTA N, LLEWELLYN M, SANCHEZ H, ADAMSON S, MILES G.A, LÓPEZ E, GONZÁLEZ N, PATTERSON J.S, GAUNT M.W, de ARIAS A.R, MILES M.A. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 225–233, fev. 2005.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 78, n. 1, p. 87–111, 2006.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Parasitology International**, v. 57, n. 2, p. 105–109, jun. 2008.

ZINGALES B, SOUTO R.P, MANGIA R.H, LISBOA C.V, CAMPBELL D.A, COURA J.R, JANSEN A, FERNANDES O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 105–12, jan. 1998.

ZINGALES B, ANDRADE S.G, BRIONES M.R, CAMPBELL D.A, CHIARI E, FERNANDES O, GUHL F, LAGES-SILVA E, MACEDO A.M, MACHADO C.R, MILES M.A, ROMANHA A.J, STURM N.R, TIBAYRENC M, SCHIJMAN A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–4, nov. 2009.