

Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – CBIOL
Laboratório de Morfopatologia – LMP

Avaliação da influência da infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* nas alterações imunopatogênicas no colón de camundongos infectados pela cepa VL-10.

Flávia de Souza Marques

Ouro Preto, Minas Gerais
Novembro de 2018

Flávia de Souza Marques

Avaliação da influência da infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* nas alterações imunopatogênicas no colón de camundongos infectados pela cepa VL-10.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como parte das exigências do programa para aquisição do grau de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração de Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Ouro Preto, Minas Gerais
Novembro de 2018

M347a Marques, Flávia de Souza.
Avaliação da influência da infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* nas alterações imunopatogênicas no colón de camundongos infectados pela cepa VL-10 [manuscrito] / Flávia de Souza Marques. - 2018.
71f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Paula Melo de Abreu Vieira.

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

Area de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Chagas, Doença de. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Cólon (Anatomia) - Doenças.
I. Vieira, Paula Melo de Abreu . II. Universidade Federal de Ouro Preto.
III. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



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



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 20 dias do mês de novembro do ano de 2018, às 09:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Flávia de Souza Marques, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Paula Melo de Abreu Vieira (Presidente - UFOP), pela Profa. Juliana Oliveira Braga (Membro - Externo), pelo Prof. Wanderson Geraldo de Lima (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Flávia de Souza Marques 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação das Lesões do Cólon Na Infecção Por Formas Tripomastigotas Metacíclicas Ou Sanguíneas do Trypanosoma Cruzi em Camundongos", 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 dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Profa. Juliana Oliveira Braga; segundo, Prof. Wanderson Geraldo de Lima; terceiro, Profa. Paula Melo de Abreu Vieira. 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 mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação 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 mestranda. Ouro Preto, 20 de novembro de 2018.

Presidente: Paula Melo A. Vieira

Membro: Juliana de Jesus Silva Gomes Estaudau

Membro: Wanderson Geraldo de Lima

Mestrando: Flávia de Souza Marques

COLABORADORES

Laboratório de Morfopatologia

Departamento de Ciências Biológicas – UFOP

Ms. Thaís Vieira de Carvalho

Mestranda Thays Helena Duarte

Aline Coelho Mercês

Laboratório de Imunopatologia

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro

Ms. Lívia Carvalho Mendes

Dr. Fernando Augusto Mathias Siqueira

Dra. Kátia da Silva Fonseca

Laboratório de Multiusuários

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Dra. Nívia Carolina Nogueira de Paiva

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãs. Agradeço por acreditarem em mim, e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Obrigada pelo exemplo, apoio e carinho. E ao Keké, por estar ao meu lado desde o início dessa trajetória, vivendo meus sonhos.

Agradecimentos

Primeiro agradeço a Deus por me dar forças para seguir o meu caminho.

Agradeço aos meus pais por terem me presenteado com a vida, e por terem me ensinado que o conhecimento é o nosso bem maior.

Às minhas irmãs, as mulheres mais fortes que conheço! Vocês me ensinam a ser uma pessoa melhor.

Ao Keké, melhor companheiro que poderia ter para dividir a vida. Obrigada por me apoiar em cada decisão, por cuidar de mim e por tornar a vida mais leve!

À tia Nega, fonte de amor inesgotável e incondicional. Obrigada pelas orações.

Às famílias Guimarães-Figueira, agradeço por terem me recebido de braços abertos. Agora vocês são minha família também.

Aos amigos, Chu, Cck, Weilher, Mari, Camilinha e Sávio agradeço pela amizade, mesmo que distantes.

A realização deste trabalho não seria possível sem a ajuda de colaboradores tão empenhados. Agradeço imensamente à Kátia, Carolzinha, Fernando e Livia (Chagas disease forever) pela contribuição nesse projeto.

Ao laboratório de Imunopatologia por todo apoio e suporte para realização deste trabalho. Em especial à Lu e ao João pelo apoio técnico.

À professora Cláudia Martins Carneiro por ter me recebido em seu laboratório como estudante de iniciação científica no início da graduação.

À Maria pelos ensinamentos de técnicas histológicas no início da iniciação científica.

Ao *team* Morfopatologia pela convivência diária e por toda ajuda na execução deste trabalho. Em especial agradeço à Aline, Vivi e Thays, por todas as alegrias e tristeza compartilhadas #somostodassurvivals.

À Aline Coelho, minha filhinha científica, pela contribuição e dedicação a este projeto. Ana Flávia, minha amiguinha e melhor *roommate* que eu poderia ter. Esteve presente nessa trajetória desde o primeiro dia. É uma alegria poder encerrar esse ciclo junto com você.

À Isabela, presente que o mestrado me deu. Espero que possamos percorrer juntas o caminho do doutorado.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Paula por me orientar nesse trabalho. Foi por um acaso que entrei no Laboratório, mas não foi por acaso que permaneci. Poder trabalhar com alguém que admiramos é um privilégio. Obrigada por sempre me receber de volta! Gratidão por todos os ensinamentos compartilhados.

Resumo

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, possui em seu ciclo evolutivo duas formas infectivas para os mamíferos – tripomastigota sanguínea (TS) e tripomastigota metacíclica (TM), que diferem quanto as moléculas presentes em sua superfície, impactando na interação inicial parasito/hospedeiro e influenciando o curso da infecção. Com o controle da transmissão vetorial, que ocorre por formas metacíclicas, em alguns países endêmicos, outras formas de infecção ganham importância. Nos últimos anos tem sido registrado casos de transmissão da doença de Chagas em países não-endêmicos, onde a transmissão ocorre por transfusão de sangue e/ou doação de órgãos, provenientes de formas sanguíneas. Dessa maneira, avaliar a influência da infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, nas alterações imunopatológicas no sangue e no cólon de camundongos infectados pela cepa VL-10, permitirá uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese da doença de Chagas. Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações relacionadas aos parâmetros imunopatogênicos no cólon durante as fases aguda e crônica da infecção experimental de camundongos *Swiss* infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa VL-10 do *T. cruzi*. Os animais infectados com formas TS apresentaram 100% de sobrevivência, enquanto essa porcentagem no grupo TM foi de apenas 52%. Além disso, animais infectados com formas TS apresentaram maior área sobre a curva de parasitemia em relação ao grupo TM. A análise das células mononucleares do sangue periférico demonstrou um aumento no percentual de monócitos na fase aguda nos animais infectados com formas TM. Já análise de linfócitos TCD8⁺ e linfócitos TCD4⁺ mostrou que independente da fonte do inóculo, houve um aumento e uma redução no percentual dessas células, respectivamente, sendo estas mais precoce no grupo TM. A quantificação da carga parasitária tecidual mostrou que no cólon dos animais infectados com formas TM o número de parasitos foi maior nos dias 7 e 14 após a infecção em relação ao grupo TS. Já no 28, 42 e 180 houve uma inversão desse perfil, apresentando os animais do grupo TS maior carga parasitária nesse órgão quando comparado aos animais do grupo TM. A avaliação do processo inflamatório mostrou que há um aumento dos núcleos celulares nos animais infectados com formas TS e TM nos dias 28, 42 e 50 em relação ao grupo controle, entretanto, na fase crônica da doença os animais infectados com formas TS já apresentavam redução do infiltrado inflamatório enquanto que nos animais infectados com formas TM foi observado presença de processo inflamatório em 240 DAI, sendo também observado aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias nos animais infectados com formas TM nessa fase da doença em relação ao grupo controle. A avaliação da denervação do plexo mioentérico demonstrou uma redução em ambos os grupos infectados em relação controle, sendo que mais precoce no grupo TM. Esses resultados sugerem que a infecção por formas TM promove um elevado parasitismo na fase aguda, provocando uma exacerbada ativação do sistema imune, que pode estar relacionado com uma precoce denervação do plexo mioentérico no cólon e também pode ser o responsável pela manutenção do processo inflamatório na fase crônica da doença.

Abstract

Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease, has in its life cycle two infective forms for mammalian hosts - blood trypomastigote (BT) and metacyclic trypomastigote (MT), that differs as to molecules present on their surface, altering the initial relationship parasite/host and impacting in the course of the infection. With the control of vectorial transmission, that is caused by MT forms in endemic countries, other pathways of infection become important. In the last years has been reported transmission of Chagas disease in non-endemic countries, where transmission occurs by blood transfusion and / or organ donation, thanks to the presence of BT forms. In this sense, to evaluate the influence of infection caused by BT or MT forms of *T. cruzi*, in the immunopathological changes in the colon of *Swiss* mice infected by the VL-10 strain of *T. cruzi* will allow a better understanding of mechanisms related to pathogenesis of the disease. Based on this, this work aimed evaluate immunopathogenic parameters in the colon during acute and chronic phases of experimental infection in *Swiss* mice infected with BT or MT forms of VL-10 strain of *T. cruzi*. Animals infected with BT forms showed 100% of survival, while this percentage on MT group was only 52%. Moreover, animals infected with BT forms presented greater parasitemia area under the curve than animals infected with MT forms. Analysis of mononuclear cells in the peripheral blood showed an increase in the percentage of monocytes in the acute phase in animals infected with MT forms. Analysis of TCD8⁺ and TCD4⁺ lymphocytes showed that there was an increase and decrease, respectively, independent of the source of inoculum, being earlier in the animals infected with MT forms. The quantification of parasitic load showed that in the colon of animals infected with MT forms the number of parasites was greater at the days 7th and 14th post infection, in relation to TS group. At the days 28th, 42th and 180th a profile inversion was observed, presenting animals of BT group higher parasitism in this organ when compared with animals infected with MT forms. Inflammatory process evaluation demonstrated that there was an increase in the number on cellular nuclei in the animals infected with BT or MT forms at the days 28th, 42th and 50th post infection in relation to non-infected animals. However, on the chronic phase, animals infected with BT already presented reduction of inflammatory process, while animals infected with MT forms showed inflammatory infiltrate at 240th post infection, as well rise of pro-inflammatory cytokines production when compared with control group. Evaluation of denervation of myenteric plexus showed a reduction in both groups in relation to control, being earlier in MT group. Based on these data, the infection by MT forms leads to a higher tissue parasitism in the acute phase, an exacerbated activation of the immune system, that could be related to an earlier denervation of myenteric plexus and be responsible for the maintenance of the inflammatory process on chronic phase of the disease.

Abreviaturas

Be-78: Berenice-78

DAI: Dias após a infecção

PIP3: Fosfatidilinositol 1,4,5-Fosfato

PLC: Fosfolipase CGIPLs: Glicoinositolfosfolípideo

gp82: Glicoproteína 82

gp85 Glicoproteína 85

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

IFN- γ : Interferon gama

IL-12 Interleucina - 12

IL-6: Interleucina-6

iNOS: Enzima óxido nítrico sintase induzível

LB: Linfócito B

LT: Linfócito T

NI: não-infectado

NK :Células Natural Killer

NO: Óxido Nítrico

PTK: Proteína tirosina kinase

SNC: Sistema Nervoso Central

SNE: Sistema Nervoso Entérico

SNP: Sistema Nervoso Periférico

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TNFRs: receptores do tipo Toll-like TNF- α : Fator de Necrose Tumoral-alfa

TS: tripomastigota sanguínea

TM: tripomastigota metacíclica

Lista de Figuras

Figura 1: Análise do percentual linfócitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e B CD19 ⁺	18
Figura 2: Análise do percentual de monócitos CD14 ⁺ . (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1.....	18
Figura 3: Taxa de sobrevivência de camundongos Swiss infectados com formas TS ou TM da cepa VL-10 do <i>T. cruzi</i>	24
Figura 4: Parasitemia de camundongos Swiss infectados formas TS ou TM da cepa VL-10 do <i>T. cruzi</i>	25
Figura 5: Percentual de monócitos (CD14 ⁺), linfócitos B (CD19 ⁺), T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no sangue periférico de camundongos não infectados e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i> avaliados nas fases aguda e crônica da infecção.....	27
Figura 6: Número de parasitos no cólon de camundongos Swiss infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i> e eutanaziados ao longo das fases aguda (7, 14, 28 e 42, 50 DAI) e crônica da infecção (180 e 240 DAI).....	28
Figura 7: Quantificação de núcleos celulares na camada muscular do cólon de camundongos infectados por formas TS ou TM da cepa VL-10 do <i>T. cruzi</i> avaliados ao longo das fases aguda e crônica da infecção.	30
Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção com formas tripomastigostas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 9: Quantificação da área de neoformação de colágeno na camada muscular do cólon de camundongos não infectados e infectados por formas TS ou TM da cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i> avaliados na fases aguda e crônica da infecção.....	32
Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos do da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção com formas tripomastigostas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
Figura 11: Avaliação morfométrica da área PGP 9.5-IR no cólon de camundongos Swiss infectados com formas tripomastigostas sanguíneas (TS) ou metacíclicas TM da cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção com formas tripomastigostas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa VL-10 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	35

Figura 13: Quantificação das citocinas no cólon de camundongos não infectados e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fases aguda e crônica da infecção..... 37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares. 17

Tabela 2: Valores parasitêmicos referentes aos animais infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa VL-10 do *T. cruzi*. 25

.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 Formas infectantes e a relação parasito/hospedeiro	5
1.3 O trato digestório e seu envolvimento na doença de Chagas	7
1.4 Resposta imune na doença de Chagas.....	9
1.5 Imunopatogenia do megacólon na doença de Chagas	10
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 - Objetivo Geral	13
3.2 - Objetivos Específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Animais e infecção pelo <i>T. cruzi</i>	14
4.2 Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas de cultura	14
4.3 Infecção pelo <i>T. cruzi</i>	15
4.4 Curvas de parasitemia	15
4.5 Taxa de sobrevivência.....	16
4.6 Coleta de sangue	16
4.7 Imunofenotipagem do sangue periférico	16
4.7.1 - Análise do percentual de linfócitos.....	17
4.7.2 - Análise do percentual de monócitos.....	17
4.8 Necropsia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica	18
4.9 Carga parasitária	19
4.10 Avaliações histopatológicas	20
4.10.1 Colorações empregadas	20
4.10.2 Análises morfométricas.....	21
4.11 Avaliação dos componentes do plexo mioentérico (Auerbach)	21
4.12 Dosagem de citocinas por CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>).....	22
4.13 Análises Estatísticas.....	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Sobrevivência.....	24
5.2 Parasitemia.....	24
5.3 Imunofenotipagem das células no sangue periférico	26
5.4 Parasitismo tecidual	28
5.5 Processo inflamatório	29

5.6	Quantificação da neoformação de colágeno	32
5.7	Plexo de Auerbach – Análise da área PGP 9.5 imunomarcada	34
5.8	Análise das citocinas presentes no cólon.....	36
6.	DISCUSSÃO	38
7.	CONCLUSÃO.....	48
8.	REFERÊNCIAS	49

1.INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

Descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909, a doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, é uma protozoonose endêmica em 21 países da América Latina, causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Chagas, 1909). Segundo dados da Organização mundial de saúde, aproximadamente 7 milhões de pessoas encontram-se infectadas em todo o mundo (WHO, 2018). Mais de 70 milhões de pessoas encontram-se sob risco de contrair a infecção, principalmente nos países endêmicos. Além disso, menos de 1% da população infectada tem acesso ao diagnóstico e tratamento, sendo registradas, anualmente, cerca de 7500 mortes devido a complicações da doença, e (DNDi, 2018).

Clinicamente, a doença de Chagas apresenta duas fases distintas. A fase aguda, que se inicia logo após a infecção, tem duração de 6 a 8 semanas aproximadamente, e apresenta sinais e sintomas inespecíficos tais como febre, mal-estar, edema de face e de membros inferiores, podendo ocorrer também linfadenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia (Kirchhoff, 1993). Essa fase da doença é caracterizada por elevados níveis de parasitemia e parasitismo tecidual (Andrade e Andrews, 2005a) e sinais de porta de entrada, como o Sinal de Romanã (edema unilateral bipalpebral) e chagoma de inoculação (local da picada) podem estar presentes em pacientes infectados pela via vetorial, ambos são caracterizados histologicamente por infiltrado de células mononucleares no local da infecção (Teixeira *et al.*, 2002).

Posteriormente à fase aguda, inicia-se a fase crônica da doença de Chagas, na qual cerca de 70% dos pacientes permanecem assintomáticos, desenvolvendo a forma indeterminada da doença. Esses pacientes apresentam positividade sorológica e/ou parasitológica para doença de Chagas, eletrocardiograma e raio-x de cólon, esôfago e tórax normais (Rassi Jr *et al.*, 2010). No entanto, 30 a 40% dos pacientes desenvolvem a fase crônica determinada da doença que pode apresentar-se sob as formas cardíaca, com acometimento do coração; digestiva, com quadros de megaesôfago e/ou megacólon; ou ainda cardiodigestiva, com comprometimento concomitante do coração e do trato digestório. Essas manifestações clínicas podem levar até 30 anos para aparecerem (Jc, 1995).

O *T. cruzi*, é um protozoário que possui quatro estágios morfológicos durante seu ciclo biológico. Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo se infecta ao ingerir o sangue do mamífero que contém formas tripomastigotas sanguíneas. No hospedeiro invertebrado, ao alcançarem o estômago, sob condições de pH e temperatura específicas, essas formas se transformam primeiramente em epimastigotas, que se multiplicam por divisões binárias. No reto do vetor se transformam em tripomastigotas metacíclicas, que durante novo repasto sanguíneo são liberadas nas fezes ou urina no local da picada. A transmissão vetorial da doença ocorre quando essas formas penetram o hospedeiro vertebrado através de microlesões na pele ou através da mucosa íntegra. Uma vez no hospedeiro vertebrado, tripomastigotas metacíclicas invadem células próximas ao local de penetração, onde se diferenciam em formas amastigotas. No interior das células, as formas amastigotas multiplicam-se por divisões binárias, diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas que são liberadas na circulação, sendo capazes de infectar células de vários tecidos, principalmente cardiomiócitos e células musculares lisas, onde transformam-se novamente em amastigotas intracelulares, com capacidade replicativa, disseminando o parasito para os diferentes tecidos e órgãos. (Machado *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 1998; Tyler e Engman, 2001; Andrade e Andrews, 2005b; Rassi Jr *et al.*, 2010).

Além da transmissão vetorial clássica, os mecanismos de transmissão da doença incluem: transfusão de sangue (Young *et al.*, 2007), transmissão oral (através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com as formas metacíclicas do *T. cruzi*) (Shikanai-Yasuda *et al.*; 1991; Coura, 2006; Dias, 2006), transmissão vertical (Schmunis, 2007; Coura e Dias, 2009), por transplantes de órgãos (Centers For Disease Control And Prevention, 2006), transmissão congênita (Gürtler *et al.*, 2003; Dorn *et al.*, 2007) e ainda, acidentes laboratoriais (Prata, 2001).

Em 1991 países pertencentes ao cone sul: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, e Uruguai criaram programas nacionais de combate ao principal vetor dessa região, *Triatoma infestans*, tanto nos domicílios quanto no ambiente peridomiciliar (WHO, 2002). Esses países investiram mais de 200 milhões de dólares no combate ao vetor; quase dois milhões de domicílios foram tratados com inseticidas no intuito de eliminar o vetor; e todos os países citados, exceto a Bolívia, implementaram controle rígido dos bancos de sangue (Schofield e Dujardin, 1997), o que permitiu a redução da transmissão vetorial nos países endêmicos.

Com a redução de casos ligados a transmissão vetorial nos países endêmicos, outras formas de transmissão ganharam importância, entre elas a transmissão sanguínea, uma vez que formas tripomastigotas sanguíneas (TS) permanecem viáveis em hemoderivados estocados nos bancos de sangue. A transmissão sanguínea pode se dar através de transfusão do sangue total, concentrado de glóbulos vermelhos, plaquetas, leucócitos, plasma fresco congelado e crio precipitado (Schmunis, 2007). Essa forma de transmissão se dá também através de transplante de órgãos, já tendo disso demonstrada a presença de formas amastigotas em vários órgãos, incluindo órgãos para os quais o parasito não possui tropismo natural (Costa *et al.*, 2018).

Na América Latina a triagem dos bancos de sangue já é realizada em todos os países, no entanto a cobertura não atinge 100%. Estima-se que no Brasil há cerca de dois milhões de pessoas infectadas com o *T. cruzi*. No nordeste brasileiro, principalmente no Ceará o risco de transmissão da doença de Chagas é alto devido à vários fatores. No contexto socioeconômico ainda existem muitas moradias que fornecem um ambiente adequado para sobrevivência e reprodução do triatomíneo. Além disso o estado é o epicentro de espécies como o *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*, que são de difícil controle pelos meios recomendados pela Fundação de saúde (Silva *et al.*, 2017).

Um estudo conduzido no Ceará no ano de 2018 por Da Costa e colaboradores mostrou que a prevalência de infecção pelo *T. cruzi* foi de 1,3% de um total de 2,822 possíveis doadores, reforçando a importância do rastreio da doença de Chagas em possíveis doadores de sangue ou órgãos.

Com a migração de pacientes chagásicos para locais onde não há controle rígido dos bancos de sangue, a doença de Chagas se tornou um problema de saúde mundial a partir dos anos 80 (Schmunis, 2007; Coura e Viñas, 2010; Coura e Dias, 2009). Doação de órgãos e sangue, além da transmissão congênita são as principais formas de infecção em países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e países da Europa.

Nos Estados Unidos, apesar de haver transmissão endozoótica pelo *T. cruzi*, envolvendo aproximadamente 11 espécies de triatomíneos, uma grande variedade de mamíferos silvestres e cães domésticos (Kjos *et al.*, 2008), a maioria dos pacientes infectados são oriundos de regiões endêmicas da América Latina. A triagem dos bancos de sangue do país teve início em janeiro de 2007, mas por não ser uma obrigatoriedade do órgão que fiscaliza comidas e medicamentos no país - *Food and Drug Administration* (FDA), cada estado tem uma lei específica, e a cobertura de rastreamento varia de 75 a

90% (Bern e Montgomery, 2009). Mesmo com esse controle estima-se que 300.000 indivíduos estejam infectados com o *T. cruzi* no país (Nunes *et al.*, 2018) e isso se deve principalmente a três fatores: (1) grande parte dos infectados não tem consciência do risco de estarem infectados; (2) a maioria dos profissionais de saúde nos Estados Unidos possui conhecimento limitado em relação à doença de Chagas, se tornando incapazes de reconhecer e encaminhar o paciente para acompanhamento adequado; (3) os medicamentos antiparasitários para tratamento da doença de Chagas não são licenciados pelo FDA, estando disponíveis apenas através do Centro de Controle e Prevenções de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention – CDC., Stimpert e Montgomery, 2010).

Na Europa, a transmissão do *T. cruzi* por doação de sangue é considerada a principal forma de infecção. As dificuldades no controle da doença incluem a grande diversidade dos sistemas de saúde, o elevado fluxo de imigrantes nos países pertencentes à união europeia (Nunes *et al.*, 2018), bem como o fato de apenas na França e Espanha ter regulamentações específicas para triagem dos bancos de sangue. Na Espanha é feito primeiramente um questionário de triagem para identificação de possíveis doadores infectados com o *T. cruzi* e posteriormente é realizado o teste sorológico. Neste país a prevalência de possíveis doadores com doença de Chagas varia de 0,05 a 1,38% (Abalo *et al.*, 2007., Castro, 2006). Na Itália e no Reino Unido, imigrantes provenientes de países endêmicos são proibidos de doar sangue, já nos demais países não existe qualquer tipo de triagem para doadores de sangue. Estima-se que na Itália o número de infectados seja 5185; na Alemanha 2225; em Portugal são 1617 e no Reino Unido o número de pessoas infectadas seja igual a 1373 (Gascon *et al.*, 2010).

Na Austrália em 2006 3,8% de 80522 imigrantes oriundos da América Latina estavam infectados com o *T. cruzi*; no Canadá essa relação foi de 3,6% de infectados para uma população de imigrantes igual a 156.960. Esses números podem ser subestimados, uma vez que imigrantes ilegais não são contabilizados (Schmunis e Yadon, 2010).

Esses dados comprovam que a doença de Chagas se tornou um problema de saúde mundial, sendo necessário buscar medidas de controle da transmissão e tratamento dos doentes. Além disso, entender os aspectos relacionados à variabilidade com que as formas sanguíneas do *T. cruzi* interagem com as células hospedeiras podem ocasionar implicações fundamentais na resposta imune contra este parasito e, conseqüentemente, na evolução clínica da doença de Chagas.

1.2 Formas infectantes e a relação parasito/hospedeiro

Sabe-se que apesar de apresentarem distintas moléculas de superfície, ambas as formas infectivas do *T. cruzi* – tripomastigota metacíclica, responsável pelas infecções vetoriais e orais e tripomastigota sanguínea, responsável pelas infecções por transfusão de sangue e transplante de órgãos – são funcionais em relação a interação parasito/hospedeiro sendo capazes de causar a infecção por um mecanismo independente da polimerização de actina do hospedeiro (Ramirez *et al.*, 1993; Fernandes e Andrews, 2012).

Já foi demonstrado que formas tripomastigotas sanguíneas (TS) apresentam em sua membrana glicoproteínas tipo mucinas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol (GPI mucinas) que são capazes de ativar potencialmente a resposta pró-inflamatória via produção de citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina-12 (IL-12), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e NO por macrófagos (Camargo *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2000). Sabe-se também que alguns glicoinositol-fosfolipídios (GIPLs) extraídos da membrana celular de formas tripomastigotas metacíclicas (TM) do *T. cruzi*, inibem ativação de macrófagos e células dendríticas, inibindo a secreção de TNF- α e IL-12 (Zambrano-Villa *et al.*, 2002).

Desta forma, pode-se concluir que as diferentes formas infectivas do *T. cruzi* diferem uma da outra, uma vez que as formas metacíclicas não estão envolvidas no início do processo inflamatório, podendo causar uma infecção no hospedeiro vertebrado de forma mais silenciosa que a causada por formas sanguíneas.

Estudos já realizados sobre a interação das formas TS do *T. cruzi* com as células hospedeiras indicam que essas utilizam duas glicoproteínas (70 e 85), membros da família das transialidases, que levam à internalização do parasito. A primeira promove essa internalização através da mobilização de Ca²⁺ intracitoplasmático. Já a glicoproteína 85 (gp85) possui ligantes para laminina e fibronectina e apresenta uma íntima relação com fosfatidilinositol 3-quinase (PI-3K), sendo que tratamentos que visam bloquear esta interação diminuem drasticamente o processo de penetração do *T. cruzi* na célula (Todorov *et al.*, 2000; Yoshida, 2006).

As formas TM do *T. cruzi*, que apresentam elevada capacidade infectiva, ligam-se à superfície da célula hospedeira por meio de moléculas, como as gp82; oligopeptidase B, trans-sialidases e cruzipaina. Essas moléculas de superfície induzem a ativação de proteínas tirosina quinases (PTK), que por sua vez acionam mecanismos de sinalização

celular envolvendo a ativação da fosfolipase C (PLC) e, conseqüentemente, a geração de fosfatidilinositol 1,4,5-Fosfato (PIP3). Estes eventos resultam na mobilização de Ca^{2+} dos seus estoques intracelulares, provavelmente do retículo endoplasmático, com um papel chave no processo de recrutamento de lisossomos e sua fusão na membrana celular. Somando-se a isso, a gp82 induz o desagrupamento da actina auxiliando o processo de internalização, muito importante para algumas células não fagocíticas (Burleigh e Andrews, 1995; Burleigh *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2006; Yoshida, 2006).

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa já demonstraram que na infecção experimental em animais infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, a interação inicial entre as formas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas sanguíneas induz um perfil distinto de resposta imunológica. Carneiro e colaboradores (2007) avaliaram cães infectados com as diferentes formas infectivas da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* na fase aguda, e demonstraram que ocorre um predomínio dos linfócitos TCD8⁺ no sangue periférico dos animais infectados com a forma TM em relação aos animais infectados pela forma tripomastigota sanguínea TS e ao grupo controle. Análises das diferentes regiões cardíacas verificaram maior expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e maior produção de óxido nítrico (NO) sérico no grupo TM, quando comparado aos animais não infectados e infectados por formas TS, sendo que o aumento dos níveis de NO no grupo TM pode ser um dos fatores determinantes da menor parasitemia observada neste grupo.

Trabalho realizado por Vieira e colaboradores (2012), mostrou que em camundongos infectados com a cepa Berenice-78 do *T. cruzi* durante a fase da doença de Chagas, a interação inicial entre as formas TM e TS induz um perfil de resposta imunológica distinto. Sendo que a infecção por formas TM ocorre de forma mais silenciosa, promovendo uma resposta imune capaz controlar o número de parasitos durante a fase aguda da infecção, além de estabelecer uma resposta imunoreguladora ao final da fase aguda, limitando o desenvolvimento das lesões associadas à doença de Chagas. Entretanto, a infecção por formas TS ocorre de uma maneira mais alarmante e mesmo com o controle da parasitemia, não há o estabelecimento de uma resposta imunoreguladora eficaz, levando a uma inflamação persistente no coração no final da fase aguda.

1.3 O trato digestório e seu envolvimento na doença de Chagas

O trato digestório é constituído pela cavidade oral, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Estes órgãos possuem características histológicas comuns, representadas pelas quatro túnicas concêntricas em suas paredes: mucosa, submucosa, muscular e serosa.

O cólon é a porção final do trato digestório, e tem como função absorção de água, fermentação, formação da massa fecal e produção de muco. Juntamente com o esôfago é um dos órgãos acometidos na forma digestiva da doença de Chagas. A mucosa do cólon é composta pela muscular, a lâmina própria e o epitélio. A lâmina própria possui grande quantidade de vasos sanguíneos e linfáticos e de células sanguíneas, importantes na função imunológica do cólon, como linfócitos e macrófagos (Freire *et al.*, 2006).

A forma digestiva da doença de Chagas é mais comum na região da bacia amazônica, principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia e Chile, sendo mais rara no Norte da América do Sul, na América Central e no México (Miles, 1998). Acredita-se que essa distribuição geográfica se deva às diferentes cepas do *T. cruzi* e a variação genética da população (Campbell *et al.*, 2004). Aproximadamente 15% dos indivíduos cronicamente infectados desenvolvem distúrbios gastrointestinais (Rezende e Luquetti, 1994).

O *T. cruzi* é capaz de provocar destruição neuronal que pode afetar tanto o Sistema Nervoso Central (SNC), quanto o Sistema Nervoso Periférico (SNP), sendo que neste último, as lesões estão mais estritamente relacionadas às vísceras ocas (Campos e Tafuri, 1973). As lesões no Sistema Nervoso Autônomo (SNA) são responsáveis pelas principais manifestações anatômicas e funcionais da doença nos órgãos ocas (coração, esôfago, intestino delgado, cólon, e mais raramente nos brônquios, ureteres e bexiga). Distúrbios anatômicos e funcionais estão diretamente relacionados à fase aguda da doença onde ocorre ruptura de pseudo-cistos com liberação e desintegração de parasitos próximos a neurônios, causando neurólise (Koberle, 1956), sendo que a extensão da destruição neuronal ainda na fase aguda está relacionada com o grau de severidade da doença na fase crônica (Tafuri, 1970).

Microscopicamente observa-se: 1) Infiltrados inflamatórios crônicos, focais e difusos na muscular da mucosa, na submucosa e nas camadas musculares; 2) Lesões do

Sistema Nervoso Entérico (SNE), especialmente do plexo mioentérico, com periganglionite e ganglionite focais ou difusas, sendo observados intensos fenômenos regressivos de neurônios, chegando à destruição completa dos gânglios nervosos do plexo mioentérico; 3) Ulcerações e inflamação crônica da mucosa, focal ou difusa em casos mais avançados, podendo atingir a submucosa; 4) Fibrose intermuscular, focal ou difusa e fibrose de substituição (Campos e Tafuri, 1973; Tafuri, 1970; Tafuri, 1987; Tafuri e Brener, 1967). Alterações ultra-estruturais do plexo mioentérico consistem em lesões geralmente focais, de todos os componentes dos gânglios: neurônios, células de Schwann e fibras nervosas, sendo que por este motivo torna-se comum, no mesmo gânglio, a existência de neurônios, às vezes, profundamente lesados ao lado de outros morfológicamente íntegros (Tafuri, 1971; Tafuri *et al.*, 1971).

No megacólon os distúrbios de motilidade estão relacionados com o alargamento do cólon e constipação (Da Silveira *et al.*, 2007) devido à presença de bolo fecal na ampola retal. A retenção progressiva do bolo fecal endurecido provoca dilatação e compressão da mucosa, frequentemente comprometendo o cólon sigmoide e o reto. A compressão leva a isquemia, que por sua vez provoca secundariamente degeneração, necrose e ulceração da mucosa. Na mucosa ulcerada inicia-se um processo inflamatório secundário e independente da inflamação induzida pela própria doença. Esse processo inflamatório atinge o plexo mioentérico já previamente lesado pelo *T. cruzi*, agravando ainda mais a destruição do SNE. Por sua vez, o plexo submucoso sofre as consequências das lesões do plexo mioentérico, devido às relações sinápticas entre eles. A inflamação secundária à estase somada à destruição dos plexos e dos componentes intersticiais evolui para a fibrose da submucosa e do conjuntivo intermuscular e como tempo ocorrem hipertrofia e alterações regressivas das fibras musculares (Tafuri *et al.*, 1971). A dificuldade no trânsito do colo fecal leva a dilatação dos outros intestinos, causando aumento do movimento intestinal, dor e desconforto físico (Teixeira *et al.*, 2006). Obstrução intestinal e ruptura são complicações características do megacólon (Prata, 1999).

Em 2007, Da Silveira e colaboradores realizaram um estudo em pacientes portadores do megacólon chagásico. A análise do processo inflamatório mostrou que pacientes com megacólon apresentaram necrose de células ganglionares, infiltrado inflamatório composto de células mononucleares e fibrose. Já nos pacientes chagásicos crônicos, mas com ausência do megacólon foi observado o mesmo, porém havia

manutenção da estrutura das células ganglionares. Neste mesmo trabalho foi realizada a análise morfométrica de neurônios imunomarcados com anticorpo anti-PGP 9.5 (produto de gene de proteína, uma proteína específica do neurônio) e os resultados demonstraram que pacientes com megacólon apresentaram fibras neuronais mais delgadas em relação ao grupo de pacientes não infectados, bem como redução da área de neurônios em relação aos pacientes portadores da doença de Chagas, mas sem megacólon.

Dessa forma, a destruição neuronal pode ser considerada um marcador do megacólon chagásico, uma vez que pacientes com megacólon apresentam redução da densidade das fibras neuronais imunomarcadas com PGP. Acredita-se que fase aguda da doença a destruição neuronal esteja associada à elevada carga parasitária no tecido, já na fase crônica, seria devido à ação do sistema imune em resposta à infecção (Da Silveira *et al.*, 2007).

1.4 Resposta imune na doença de Chagas

A resposta imune tem um papel crucial no controle da infecção causada pelo *T. cruzi*, tanto na eliminação do parasito, quanto na sua disseminação no organismo. Uma resposta imune eficiente é capaz de controlar o número de parasitos, além de limitar os danos causados pela infecção. Enquanto uma resposta imune ineficaz, não consegue reduzir a carga parasitária, levando a manutenção da resposta inflamatória e conseqüentemente às lesões teciduais (Tarleton, 2001).

Na doença de Chagas, o controle do *T. cruzi*, depende tanto da imunidade inata quanto da adquirida que são ativadas já nos estágios iniciais da doença, sendo crucial para sobrevivência do indivíduo infectado e distinção das formas clínicas da doença crônica. Há o envolvimento de células da resposta imune como: macrófagos, células *natural killer* (NK), linfócitos B (LB) e linfócitos T (LT), além da participação de citocinas Th1 pró-inflamatórias – IFN γ -, TNF- α e IL-12 (Kayama e Takeda, 2010). A interação inicial entre o parasito e o hospedeiro se dá através do reconhecimento do patógeno invasor por meio de receptores do tipo Toll-like (TLRS) que culminam na produção de mediadores inflamatórios e NO, ligando a resposta imune inata à resposta imune adaptativa (Machado *et al.*, 2012).

Na resposta imune contra parasitos intracelulares a citocina IL-12 tem papel chave na produção de IFN- γ , através da diferenciação de LT no fenótipo Th1 e ativação de células NK. A ativação de macrófagos é mediada por IFN- γ e TNF- α , culminado na

produção de NO, um dos principais responsáveis pelo controle da replicação do parasito na fase aguda da doença (Kayama e Takeda, 2010).

Já foi demonstrado que tanto linfócitos TCD4⁺ quanto TCD8⁺ apresentam um papel importante no controle da infecção provocada pelo *T. cruzi*. O padrão funcional de células T (Th1 ou Th2) desenvolvido no curso inicial da infecção pode estar relacionado com a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro à infecção, uma vez que células Th1 induzem uma resposta inflamatória, enquanto células Th2 tem uma atividade reguladora anti-inflamatória. Para uma resposta eficiente contra o *T. cruzi* é preciso a participação de linfócitos B, dessa forma estudo realizado por Cardillo e colaboradores (2007), mostrou que camundongos que não apresentaram LB maduros são insuficientes para gerar e manter células TCD8⁺ de memória central e células efectoras do subtipo Th1, uma vez que os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IFN γ e IL-12 são reduzidos em sobrenadantes de células de baço. As respostas inflamatórias teciduais nesses camundongos são muito menos intensas na fase aguda da infecção, o que é consistente com um déficit na geração de células T efectoras (Cardillo *et al.*, 2007).

1.5 Imunopatogenia do megacólon na doença de Chagas

Microscopicamente as lesões das células musculares lisas e do sistema nervoso intramural estão associadas a processo inflamatório e fibrose. As células presentes no infiltrado inflamatório são em sua maioria linfócitos T e linfócitos B, células NK e macrófagos. A denervação que ocorre na forma digestiva da doença de Chagas é caracterizada por uma redução massiva no número de neurônios, sendo que o quadro de megaesôfago está associado a uma redução de aproximadamente 85% de células neuronais, enquanto o desenvolvimento do megacólon está atrelado a uma perda neuronal de 50% (Köberle, 1968; Dutra *et al.*, 2009).

Sabe-se que o processo de denervação está associado à presença de células com potencial citotóxico. Da Silveira e colaboradores (2007) mostraram que pacientes com quadro de megacólon apresentaram um aumento no número de eosinófilos e mastócitos, quando comparados à indivíduos não infectados ou infectados, mas com ausência do megacólon. Essas células quando associadas ao processo inflamatório contribuem para lesão tecidual através da produção de citocinas, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α e bem como desenvolvimento de fibrose, outro fator importante na patogênese da doença digestiva. Além disso, já foi demonstrado a presença de células NK e linfócitos

citotóxicos TIA-1⁺ no cólon e no esôfago de pacientes chagásicos, com ou sem a forma digestiva da doença (Reis *et al.*, 2001; Da Silveira *et al.*, 2005; Da Silveira *et al.*, 2007).

As células entéricas gliais também possuem participação na patogênese dos megas. Estas células são ativadas pela atividade inflamatória, podendo contribuir ativamente para a resposta imune através da apresentação de antígenos e síntese de citocinas. Sua participação no desenvolvimento da patogênese no megacólon foi comprovada pela demonstração de que esse tipo celular apresenta fenótipos diferentes se associada à um processo inflamatório, e se está presente em porções dilatadas do órgão. Porções não dilatadas de pacientes com megacólon exibem expressão aumentada da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) em comparação com a porção dilatada do cólon no mesmo paciente e também com os cólons de indivíduos não infectados (Da Silveira *et al.*, 2007). O GFAP é uma proteína intermediária do filamento sendo expressa por vários tipos celulares do SNC e tem como função aumentar a coesão entre as células entéricas gliais (Steinkamp *et al.*, 2003; Von Boyen e Steinkamp, 2010). Esse fato sugere que um aumento na expressão de GFAP nas células gliais em pacientes chagásicos agiria como fator protetor dos corpos neuronais e uma tentativa de proteger os neurônios contra a destruição pelo processo inflamatório.

Sendo assim, um estudo sobre as alterações provocadas no SNE pela infecção pelo *T. cruzi*, e sua associação com o processo inflamatório, se torna necessário para a melhor compreensão das alterações neuroimunes que podem estar relacionadas com o desenvolvimento dos megas na forma digestiva da doença de Chagas.

2. JUSTIFICATIVA

O estudo da infecção de camundongos por diferentes formas infectantes do *T. cruzi* no decorrer das fases aguda e crônica, irá possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos relacionados à patogênese da doença de Chagas. Além disso, devido ao fato de que a infecção transfusional e congênita em países não-endêmicos é reconhecida como um sério problema, é importante saber qual o impacto da infecção por formas sanguíneas no curso da doença, principalmente no trato digestório, onde a patogênese ainda é pouco compreendida. Portanto, neste trabalho serão avaliados parâmetros relacionados às alterações imunopatológicas que ocorrem no sangue periférico bem como no colón, simulando a transmissão vetorial (infecção pelas formas TM) e transfusional (infecção pelas formas TS) ou qualquer mecanismo de transmissão que envolva essas formas. Espera-se com isso obter uma melhor compreensão de como a fonte do inóculo poderá interferir na interação inicial *T. cruzi*/hospedeiro e, conseqüentemente, direcionar o desenvolvimento das diferentes formas clínicas observadas na doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar a influência da infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*, nas alterações imunopatogênicas no cólon de camundongos infectados pela cepa VL-10.

3.2 - Objetivos Específicos

- Determinar a taxa de sobrevivência e a curva de parasitemia;
- Fenotipar as células mononucleares no sangue periférico;
- Determinar o parasitismo no cólon;
- Avaliar o infiltrado inflamatório e a neoformação de colágeno na camada muscular do cólon;
- Quantificar a área de neurônios do plexo Mioentérico no cólon;
- Avaliar os níveis teciduais das citocinas pró e anti-inflamatórias no cólon.

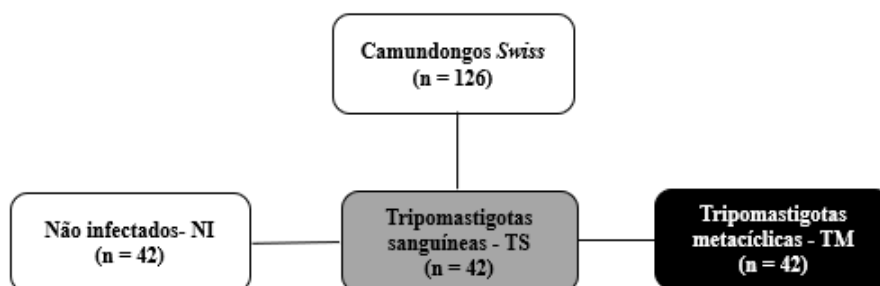
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e infecção pelo *T. cruzi*

Foram utilizados 126 camundongos *Swiss*, 30 dias de idade, machos, nascidos na Maternidade do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA – UFOP).

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: não infectados, infectados com formas TM ou infectados com formas TS. O Fluxograma 1 apresenta a distribuição dos animais nos três grupos experimentais descritos acima.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 2017/21).



Fluxograma 1 - Distribuição dos animais nos três dois grupos experimentais NI: não infectados, TS: infectados com formas tripomastigotas sanguíneas e TM: infectados com formas tripomastigotas metacíclicas.

4.2 Obtenção de formas tripomastigotas metacíclicas de cultura

Foi coletado em EDTA aproximadamente 1 mL de sangue do plexo orbital de um camundongo sabidamente infectado com a cepa VL-10 do *T. cruzi*. O sangue foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, onde foram adicionados 2 mL de meio de cultura LIT 20%. Os tubos foram mantidos em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand) à temperatura de 28°C por 7 dias. Após esse período foi realizado o repique da cultura de 7 em 7 dias, até a purificação da cultura com observação da presença de

tripomastigotas metacíclicas viáveis (vivos, com morfologia e motilidade normais) em microscópio óptico na objetiva de 40x, sendo todo o procedimento realizado em capela de fluxo laminar. Após esse período, a cultura foi diluída 10x em PBS previamente autoclavado para observar a presença e posterior contagem das formas tripomastigotas metacíclicas em câmara de Neubauer em microscópio óptico, sendo em seguida realizado o ajuste de 1×10^5 parasitos/mL para o inóculo.

Após o ajuste do inóculo, a cultura, com quantidade de parasitos conhecida, foi centrifugada a 2200 rpm por 10 minutos à 4°C para a obtenção de um pellet com as formas tripomastigotas metacíclicas. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em PBS para a realização da infecção dos animais pela via intraperitoneal.

4.3 Infecção pelo *T. cruzi*

Os animais foram inoculados com 5×10^3 formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa VL-10 do *T. cruzi*, pela via intraperitoneal. As formas sanguíneas foram obtidas de camundongos infectados pela cepa VL-10 (*T. cruzi* II), por via intraperitoneal, sendo esta cepa mantida por nosso laboratório através de passagens a cada dezoito dias em camundongos *Swiss*.

4.4 Curvas de parasitemia

Os camundongos foram avaliados diariamente para determinação da parasitemia a partir do 4º dia após a infecção (DAI) até não serem mais visualizados parasitos no sangue por cinco dias consecutivos, segundo a metodologia adaptada de Brener (Brener, 1962). Cinco microlitros de sangue da veia caudal dos camundongos foram analisados diariamente ao microscópio óptico e a curva de parasitemia plotada para cada grupo experimental empregando a média diária da parasitemia detectada nos animais. Essa foi expressa em número de tripomastigotas sanguíneas por 0,1 mL de sangue e o período pré-patente, período patente e o pico máximo de parasitemia foram determinados.

4.5 Taxa de sobrevivência

Os animais utilizados para a determinação da curva de parasitemia foram acompanhados diariamente até o 240º DAI sendo a mortalidade registrada e expressa em porcentagem cumulativa.

4.6 Coleta de sangue

Duzentos microlitros de sangue de cada animal de cada grupo foram coletados do plexo orbital aos sete, 14, 28, 42, 50, 180 e 240 DAI para a realização da imunofenotipagem do sangue periférico.

4.7 Imunofenotipagem do sangue periférico

Dentre os parâmetros imunológicos avaliados, foi realizada a caracterização do perfil fenotípico das células do sangue periférico. Em tubos de poliestireno 12x75mm, foram adicionados 20 µL do anticorpo. Foi utilizado o anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse conjugado com fluorocromo (Tabela 1). Para cada tubo com anticorpo monoclonal, foram adicionados 25µL de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2 mL de solução de lise diluída 10 vezes em água destilada. Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (1300 rpm, 7 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado, os leucócitos foram lavados com 3mL de PBS diluído 10 vezes (pH7,4), e centrifugados como descrito anteriormente. Finalmente, os leucócitos foram fixados com 200 µL de solução fixadora (10 g/L de paraformaldeído, 1 % de cacodilato de sódio, 6,67 g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de pelo menos 15 minutos a 4°C, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickinson). O programa Flowjo® foi utilizado para a aquisição de dados e para a análise dos resultados empregando diferentes estratégias.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares.

Anticorpos	Fluorocromos	Fabricante	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4	PerCP	Biolegend	RM4-5	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Invitrogen	5H10	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19	FITC	Bioscience	MB19-1	Linfócitos B
Anti-CD3	PE	Biolegend	145-2C11	Linfócitos T
Anti-CD14	FITC	Bioscience	SA2-8	Monócitos

4.7.1 - Análise do percentual de linfócitos

A análise do percentual de células NK, linfócitos T e B foi realizada através de análise convencional. A população celular de interesse (R1) (Figura 1A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a frequência de populações celulares, dentro de R1, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL2 versus FL1 (Figura 1B).

4.7.2 - Análise do percentual de monócitos

A análise do percentual de monócitos foi realizada através de análise convencional. A população celular de interesse (R1) (Figura 2A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a frequência de monócitos, dentro de R1, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de Granulosidade (SSC) versus FL1 (Figura 2B).

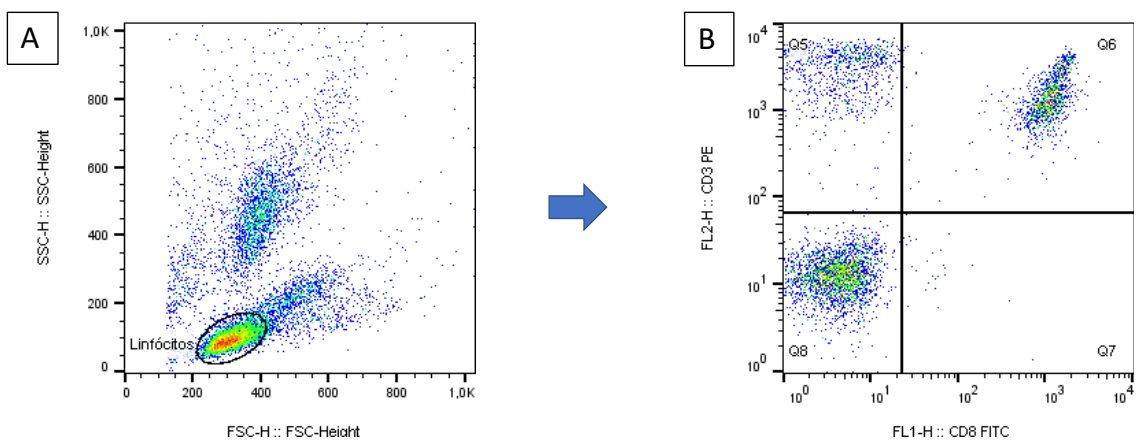


Figura 1: Análise do percentual linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B CD19⁺. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células em R1.

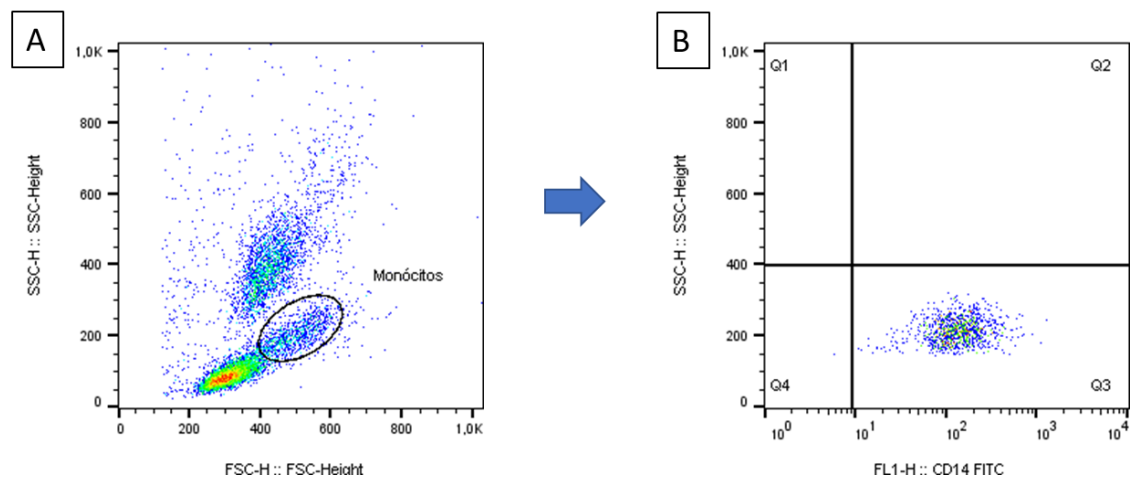


Figura 2: Análise do percentual de monócitos CD14⁺. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual SSC versus FL1 utilizado para quantificar o percentual de células em R1.

4.8 Necropsia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica

Seis animais de cada grupo foram eutanaziados, por deslocamento cervical, no 7^o, 14^o, 28^a e 42^o, 50^o, 180^o e 240^o DAI para a realização da necropsia. Durante esse procedimento foram coletados fragmentos de cólon. Uma parte do órgão, foi colocado em papel alumínio e no nitrogênio líquido para armazenamento em freezer -80^o para quantificação da carga parasitária e CBA. A outra parte do cólon foi fixada em metanol/dimetilsulfóxido, realizados rolinhos que foram processados rotineiramente e incluídos em parafina. Os blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes com espessura de quatro micrômetros. Foram confeccionadas lâminas

dos blocos parafinizados do cólon para coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) para análise rotineira das alterações histopatológicas, Tricrômico de Masson para a neoformação de colágeno e imuno-histoquímica anti-PGP 9.5 para avaliação da denervação neuronal.

4.9 Carga parasitária

Os fragmentos do cólon, previamente armazenados a -80°C , foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi, pesados, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 30 mg. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e em seguida foram realizados os procedimentos de extração do DNA utilizando o kit WizardTM Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações: foram adicionados aos tubos, contendo os tecidos, 500 μL de solução de lise nuclear e estes foram mantidos em gelo por 2 minutos. Após homogeneização por inversão dos tubos, foi adicionado 20 μL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) na concentração de 20 mg/mL. Estes foram mantidos overnight em banho seco a 55°C . Após este período, foram adicionados 3 μL de RNase e as amostras foram incubadas por 30 minutos em banho seco a 37°C . Após incubação, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos e foram adicionados 200 μL de solução de precipitação de proteínas. Com o auxílio do vortex (Certomat MV, B. Braun Biotech International, EUA), as amostras foram homogeneizadas por 20 segundos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a 16.000 g (Microcentrífuga Eppendorf®-Modelo 5418, NY, USA). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600 μL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha). Esse tubo foi então homogeneizado e centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 g. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 200 μL de solução de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha). Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 16.000 g, e novamente descartado o sobrenadante. Os tubos foram mantidos abertos para evaporação do etanol 70% remanescente e em seguida foram adicionados 100 μL de solução de hidratação. O DNA permaneceu reidratando por 24h à temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a dosagem do DNA em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA). Após a dosagem as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise por qPCR.

4.10 Avaliações histopatológicas

4.10.1 Colorações empregadas

Técnica de Hematoxilina e Eosina (HE)

A coloração por HE foi realizada em cortes histológicos do cólon para análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório. Os cortes com 4µm de espessura foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), 5 minutos cada, e lavados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina por 1,5 minutos e lavados em água corrente por 30 minutos. Posteriormente foram corados pela Eosina durante 1 minuto. Após o último processo de lavagem em água corrente e levados à estufa a 56°C para secagem. Em seguida foram montadas as lâminas com auxílio de entellan.

Técnica de Tricrômico de Masson

Para observação de tecido conjuntivo fibroso e determinação da fibrose, fragmentos de cólon foram corados pela técnica de Tricrômico de Masson. Após desparafinização e hidratação dos cortes histológicos, estes foram corados com hematoxilina por 1,5 minutos, lavados em água corrente e corados durante 10 minutos pela solução número 1 (90 mL Sudam 1% em solução alcoólica, 10 mL fucsina ácida 1% em solução aquosa e 1ml de ácido acético glacial). Posteriormente foram lavados em água corrente, corados durante 20 minutos pela solução número 2 (2,5 g ácido fosfotúngstico, 2,5 g ácido fosfomolibdico em 100 mL de água destilada), novamente lavados. Em seguida foram corados por 20 minutos pela solução número 3 (2,5 g azul de anilina, 2 mL de ácido acético glacial em 100 mL água destilada), lavados e submetidos à solução de ácido acético 1% durante 3 minutos. Realizado o último processo de lavagem, os cortes foram secados em estufa (56°C) e montados em lâminas com auxílio de entellan.

4.10.2 Análises morfológicas

Quantificação do processo inflamatório

Para quantificação do processo inflamatório as análises foram feitas utilizando a objetiva 40x. Todos os núcleos celulares presentes foram quantificados em 30 imagens (campos) aleatórias para cólon (área total percorrida igual a $1064811\mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40x foram digitalizadas através do microscópio Leica DM5000B com uma microcâmara acoplada e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.0 R1) ambos pertencentes ao Laboratório Multiusuário do NUPEB. Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3. O processo inflamatório foi determinado pela diferença significativa ($p < 0,05$) entre o número de núcleos celulares presentes nos animais infectados pelo *T. cruzi* e aquele observado nos animais não infectados.

Quantificação da neoformação de colágeno

Para quantificação da fibrose as análises foram feitas utilizando a objetiva 40x, foram fotografados 30 campos aleatórios nos cortes corados por Tricrômico de Masson de cada animal do estudo (área total percorrida igual a $1064811\mu\text{m}^2$). Os pixels com tons de azul foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total ocupada por fibrose.

4.11 Avaliação dos componentes do plexo mioentérico (Auerbach)

Neste estudo foram realizadas análises morfológicas das áreas PGP 9.5 imunorreativas (PGP 9.5-IR) restritas às regiões ganglionares do plexo de Auerbach. Os cortes desparafinizados e hidratados foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato durante 20 minutos a 96°C . Após resfriamento, foi realizado bloqueio duplo da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com soro normal de cabra (1:50) em câmara úmida e à temperatura ambiente. Posteriormente, o anticorpo primário produzido em coelho anti- PGP 9.5 (1:50; Z5116-Dako Cytomation, Carpinteria, USA) foi adicionado aos cortes. Após incubação a 4°C durante 18 horas, o Kit Streptavidina-Biotina (K0675-Dako Cytomation, Carpinteria, USA), foi aplicado e os cortes mantidos em câmara úmida à 37°C durante uma hora (para cada reagente do Kit) e a atividade enzimática foi revelada com

diaminobenzidina (D-5637; Sigma, St. Luis, MO, USA) em Tampão Salina Fosfato (PBS), pH 7.2 – 7.4. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e cobertos com entellan (1.07961.0100- Merck, Darmstadt, Alemanha) e lamínula. Como controle negativo de cada reação, foram utilizados cortes nos quais o anticorpo primário foi substituído por diluente de anticorpo (S3022- Dako Cytomation, Carpinteria, USA).

A inervação do plexo mioentérico foi analisada pela medida da área PGP 9.5-IR restrita e relativa à área ganglionar. Essas avaliações foram realizadas em todas as imagens que continham neurônios por toda a lâmina, visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmara Leica MC170HD, associada ao microscópio Leica DM5000B e analisadas com o auxílio do *software* de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.12 Dosagem de citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*)

A quantificação dos níveis de citocinas foi realizada pela técnica de Cytometric Bead Array (BD Biosciences) utilizando o *kit mouse-inflammation cytokine* que permite a quantificação das citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF e IL-12p70 e da quimiocina MCP-1. Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Os fragmentos de cólon com massa 30 mg previamente coletados no momento da necropsia e armazenados em freezer -80°C foram homogeneizadas utilizando um homogeneizador de tecidos *Tissuelyser* (Quiagen) em 500 μ L de um coquetel inibidor de protease (Sigma Chemical CO, St Louis, USA). Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 \times g durante 10 minutos a 4° C e os sobrenadantes foram armazenados a -80° C antes da análise. Assim, as amostras foram descongeladas, previamente, em banho-maria a 37°C e, em seguida, centrifugadas a 10.000 \times g por 10 minutos para a coleta do sobrenadante. O padrão foi reconstituído em 2,0 mL de Reagente G uma solução tampão usada como diluente, nas seguintes diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256. Foi preparada uma mistura de Beads (A1-A6), contendo 3 μ L de cada suspensão de Beads, a fim de se atingir um volume final de 21 μ L para cada amostra. As Beads foram adicionadas a 25 μ L dos padrões, em suas respectivas diluições, tal como a 25 μ L de cada amostra em seu respectivo tubo. Foram adicionados a todos os tubos 18 μ L do Reagente B, um reagente de detecção marcado com ficoeritrina (PE) e incubados por um período de 2 horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, foram adicionados 500 μ L do Reagente F, uma solução tamponada de lavagem, em cada

tubo e centrifugados a 600 xg por 7 min a 18°C. O sobrenadante foi aspirado com auxílio de bomba de vácuo, deixando cerca de 100 µL do sobrenadante em cada tubo. Foi realizada uma nova adição de 100 µL de Reagente F partindo para a leitura. Para aquisição e armazenamento dos dados foi empregado o citômetro de fluxo (FACSCALIBUR - BD Biosciences). As curvas padrão para cada citocina foram traçadas e as concentrações de cada amostra de teste em picogramas por mililitro (pg / mL) foram calculadas usando a matriz de *software* FCAP v.3 (BD Biosciences).

4.13 Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para confirmar os padrões de normalidade. Quando os dados foram paramétricos para comparação entre os grupos foram realizadas análises Teste T *Student* (quando era apenas entre os grupos infectados) ou de variância (ANOVA *one-way*), quando as alterações foram significativas, o teste de Bonferoni foi realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias. Para os dados classificados como não-paramétricos foi realizada a análise de *Mann-Whitney* (quando era apenas entre os grupos infectados) ou de *Kruskal-Wallis* seguida pelo teste de Dunns. Foram consideradas significativas as diferenças entre médias com valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Sobrevida

A taxa de infectividade entre os animais inoculados com as formas TS ou TM foi de 100%, enquanto a taxa de sobrevida foi de 100% nos animais infectados com formas TS e de 52% nos animais infectados com formas TM ao longo dos 240 dias de avaliação (Figura 3).

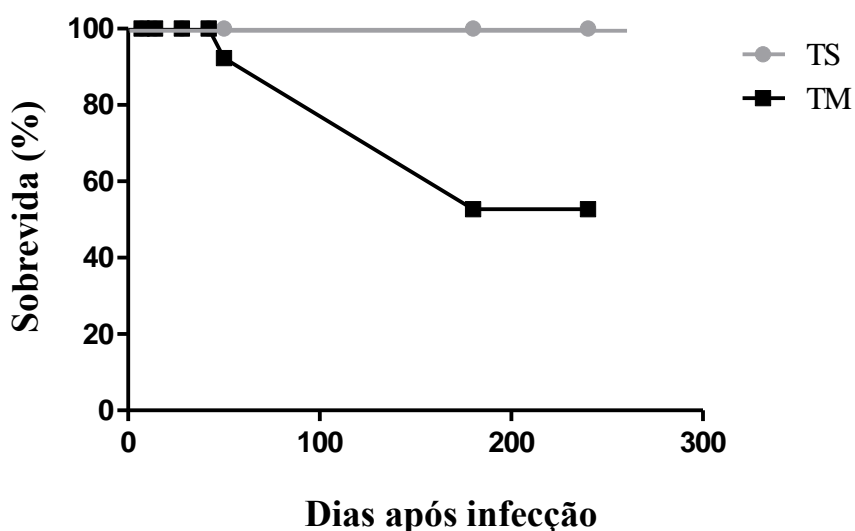


Figura 3: Taxa de sobrevivência de camundongos *Swiss* infectados com formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ●) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa VL-10 do *T. cruzi*. Cada curva representa a média dos animais infectados de cada grupo durante 240 dias após a infecção.

5.2 Parasitemia

Na Figura 4 e Tabela 2 observam-se as médias das curvas de parasitemia e dados obtidos das mesmas referentes aos animais pertencentes aos grupos TS e TM. No grupo TS constatou-se período pré-patente de 7 dias, patente de 57 dias e pico máximo de parasitemia no 26º DAI (679.593,00 tripomastigotas / 0,1 mL de sangue). Já no grupo TM o período pré-patente foi menor (6 dias), com período patente de apenas 36 dias e o dia do pico máximo de parasitemia, no 20º DAI DPI (3.406.250,00 tripomastigotas/0,1 mL de sangue). Apesar de apresentarem menor pico de parasitemia, os animais do grupo TS apresentaram a área sobre a curva significativamente maior ($p = 0,001$) quando comparados aos animais do grupo TM.

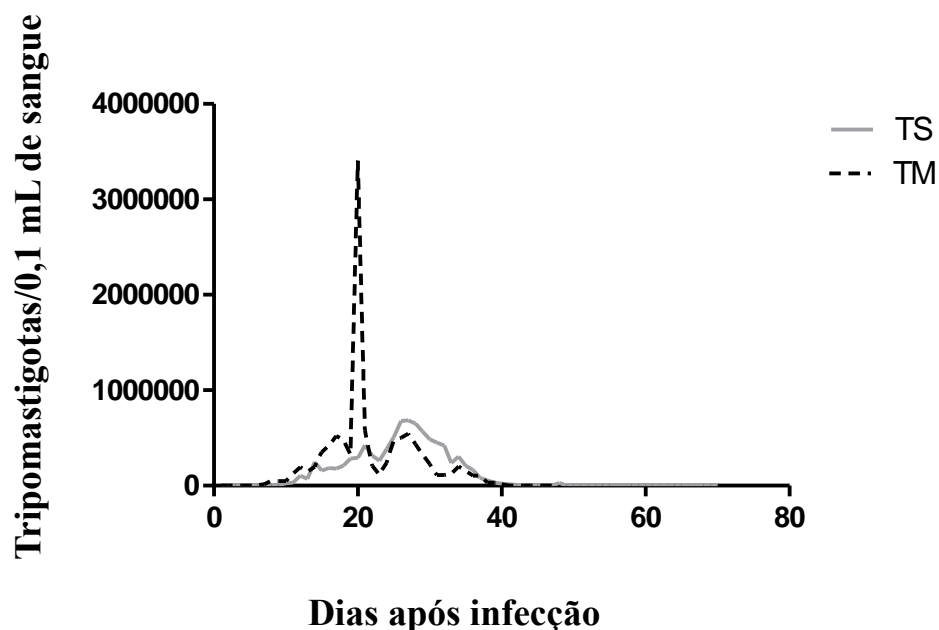


Figura4: Parasitemia de camundongos *Swiss* infectados formas tripomastigotas sanguíneas (TS; —) ou metacíclicas (TM; - - -) da cepa VL-10 do *T. cruzi*. Cada curva representa a média de 12 animais de cada grupo infectado.

Tabela 2: Valores parasitêmicos referentes aos animais infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa VL-10 do *T. cruzi*.

Grupos	PPP (dia)	PP (dia)	PMP	DMPP	ASC
TS	7	57	679.593,00	26	8.807.000*
TM	6	36	3.406.250,00	20	6.731.000

PP: período pré-patente; PP: período patente; PMP: valor de tripomastigotas no pico máximo de parasitemia (tripomastigotas / 0.1 mL de sangue; DMPP: dia do pico máximo de parasitemia; ASC: área sob a curva. “*” representa diferença significativa entre os grupos de animais infectados com formas tripomastigotas metacíclicas ou tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*.

5.3 Imunofenotipagem das células no sangue periférico

O impacto da infecção causada na resposta imune sistêmica foi avaliado a partir da caracterização das células presentes no sangue periférico de camundongos infectados por formas TS ou TM do *T. cruzi* durante as fases aguda e crônica da infecção e está representando na figura 5.

A quantificação de monócitos no sangue periférico mostrou que animais infectados com formas TM apresentaram percentual significativamente maior de monócitos nos dias 14, 28 e 42 quando comparados aos animais dos grupos Controle e infectados com formas TS.

Já a avaliação de Linfócitos B mostrou que independente da fonte do inóculo há uma redução significativa no 28° dia após a infecção nos animais dos grupos infectados quando comparados ao grupo Controle. Além disso, para os animais infectados com formas TM essa redução começa a ocorrer já no 14° DAI e se mantém até o 42° DAI em relação aos grupos TS e Controle.

Em relação aos linfócitos T CD4⁺, foi observado nos animais infectados pelas formas TM uma redução precoce no percentual dessas células já no 14° DAI quando comparado aos grupos Controle e TS, permanecendo com níveis reduzidos até os 180 dias após a infecção em relação aos animais do grupo Controle. Entretanto, para os animais do grupo TS a redução significativa de células T CD4⁺ só é observada nos dias 28 e 42 após a infecção quando comparado aos animais do grupo Controle.

A análise de linfócitos T CD8⁺ mostrou que independente da forma infectiva, o percentual dessas células no sangue segue um padrão similar entre os grupos infectados durante todo o curso da infecção, ocorrendo um maior percentual dessas células no 28° DAI quando comparado aos animais do grupo Controle. Além disso, os animais infectados com formas TM apresentaram maior percentual de linfócitos T CD8⁺ nos dias 42 e 50 após a infecção quando comparados aos animais do grupo TS, e um aumento no dia 180 em relação ao grupo Controle.

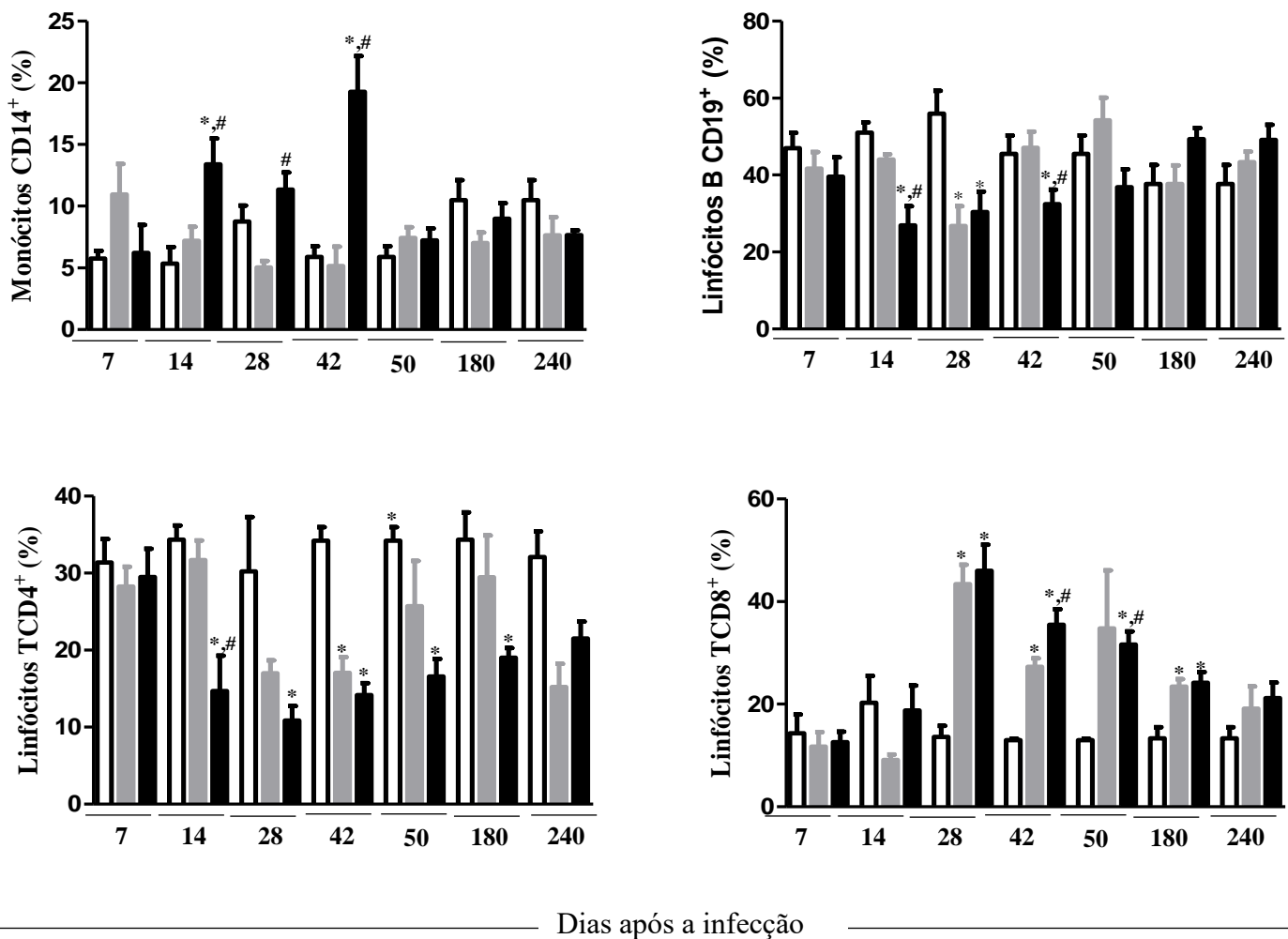


Figura 5: Percentual de monócitos (CD14⁺), linfócitos B (CD19⁺), T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* avaliados nas fases aguda e crônica da infecção. “*” representa diferenças significativas dos grupos infectados em relação ao grupo controle. “#” representa diferenças significativas entre os grupos infectados. Os valores foram expressos como média ± erro padrão.

5.4 Parasitismo tecidual

Para avaliar o impacto da infecção pelas diferentes formas infectantes do *T. cruzi*, TS e TM, no parasitismo tecidual do cólon foi realizada a quantificação do mesmo através da Real Time PCR, e os resultados estão apresentados na Figura 6.

Foi observado maior parasitismo tecidual do cólon nos animais infectados com formas TM no 7º e 14º DAI em relação aos animais infectados com formas TS. Entretanto, nos dias 28, 42 e 180 houve uma inversão desse perfil, apresentando os animais do grupo TS maior carga parasitária nesse órgão quando comparados aos animais do grupo TM.

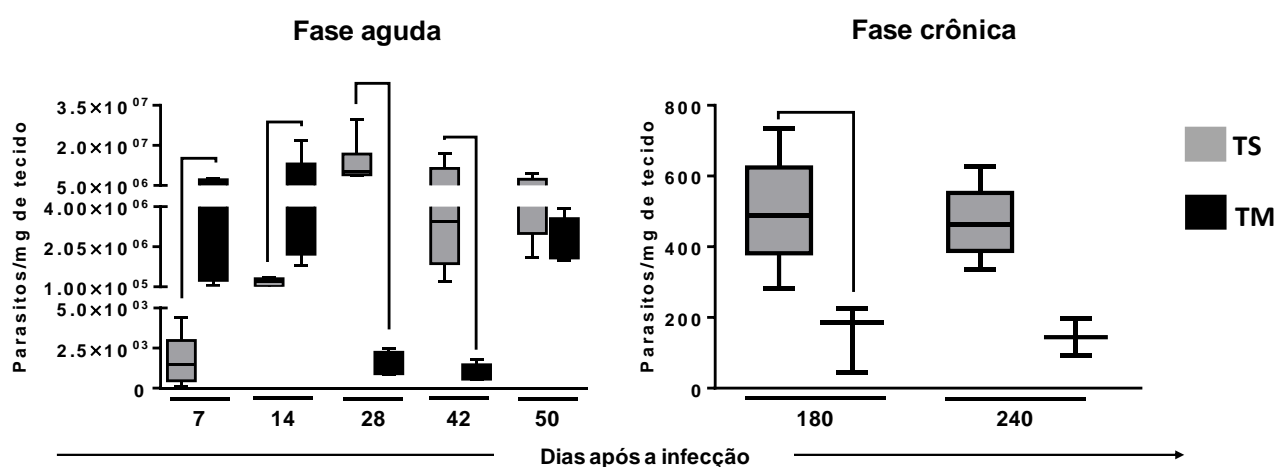


Figura 6: Número de parasitos no cólon de camundongos *Swiss* infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* e eutanaziados ao longo das fases aguda (7, 14, 28 e 42, 50 DAI) e crônica da infecção (180 e 240 DAI). Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão de seis animais por grupo em cada tempo. Linhas conectoras representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos TM e TS.

5.5 Processo inflamatório

O impacto da infecção pelas diferentes formas infectivas do *T. cruzi* foi verificado sobre as alterações histopatológicas no cólon durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas e os resultados da análise quantitativa e qualitativa do processo inflamatório na camada muscular estão apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.

A análise morfométrica da camada muscular do cólon mostrou que animais infectados com formas TS apresentaram presença de processo inflamatório em comparação com animais não infectados no 42° e 50° DAI. Já nos animais infectados com formas TM a inflamação se apresenta mais precocemente, no 28° DAI, permanecendo no 42° e 50° DAI, e ainda na fase crônica tardia da doença de Chagas, 240 DAI. A comparação entre os dois grupos infectados, mostrou um aumento do processo inflamatório no 28° DAI nos animais infectados com formas TM em relação aos animais infectados com formas TS no mesmo período.

A análise longitudinal do grupo TS mostrou que 180° DAI, fase crônica da doença de Chagas, ocorre uma redução da inflamação em relação aos dias 42 e 50 após infecção, mostrando uma resolução do quadro inflamatório para os animais infectados com essa forma. Já a análise longitudinal do grupo de animais infectados com formas TM, mostrou que em 240 DAI há presença de infiltrado inflamatório quando comparado ao 7° DAI.

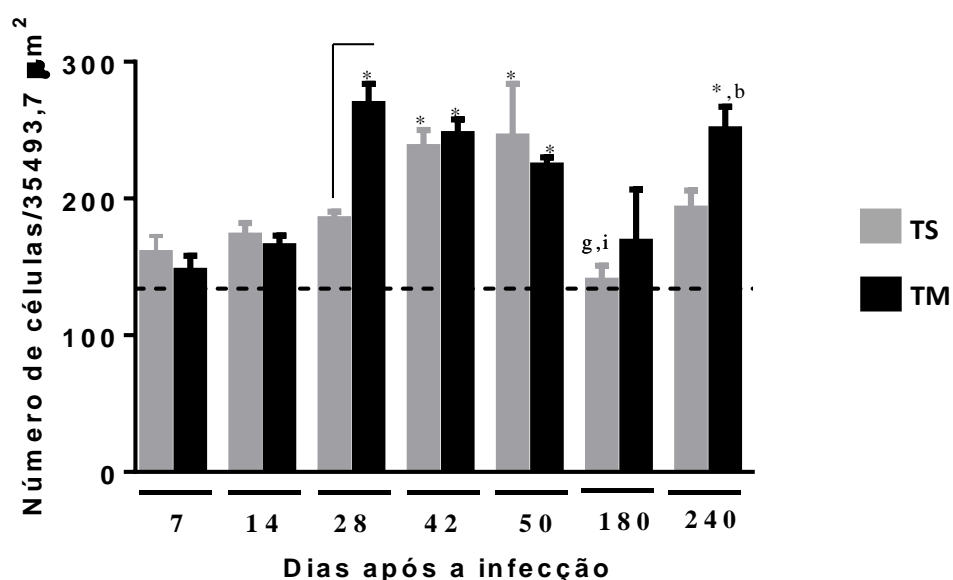


Figura 7: Quantificação de núcleos celulares na camada muscular do cólon de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa VL-10 do *T. cruzi* avaliados ao longo das fases aguda e crônica da infecção. As linhas conectoras representam diferenças significativas no mesmo período de tempo entre os grupos de animais infectados. As letras “a”, “c”, “e”, “g”, “i”, “k”, “m” representam diferenças significativas em relação aos dias 7, 14, 28, 42, 50, 180 e 240 no grupo TS, respectivamente; e as letras “b”, “d”, “f”, “h”, “j”, “l” e “n” representam diferenças significativas em relação aos dias 7, 14, 28, 42, 50, 180 e 240 no grupo TM. “*” representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais não infectados. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos de animais não infectados ($n=42$). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão de seis camundongos por grupo em cada tempo.

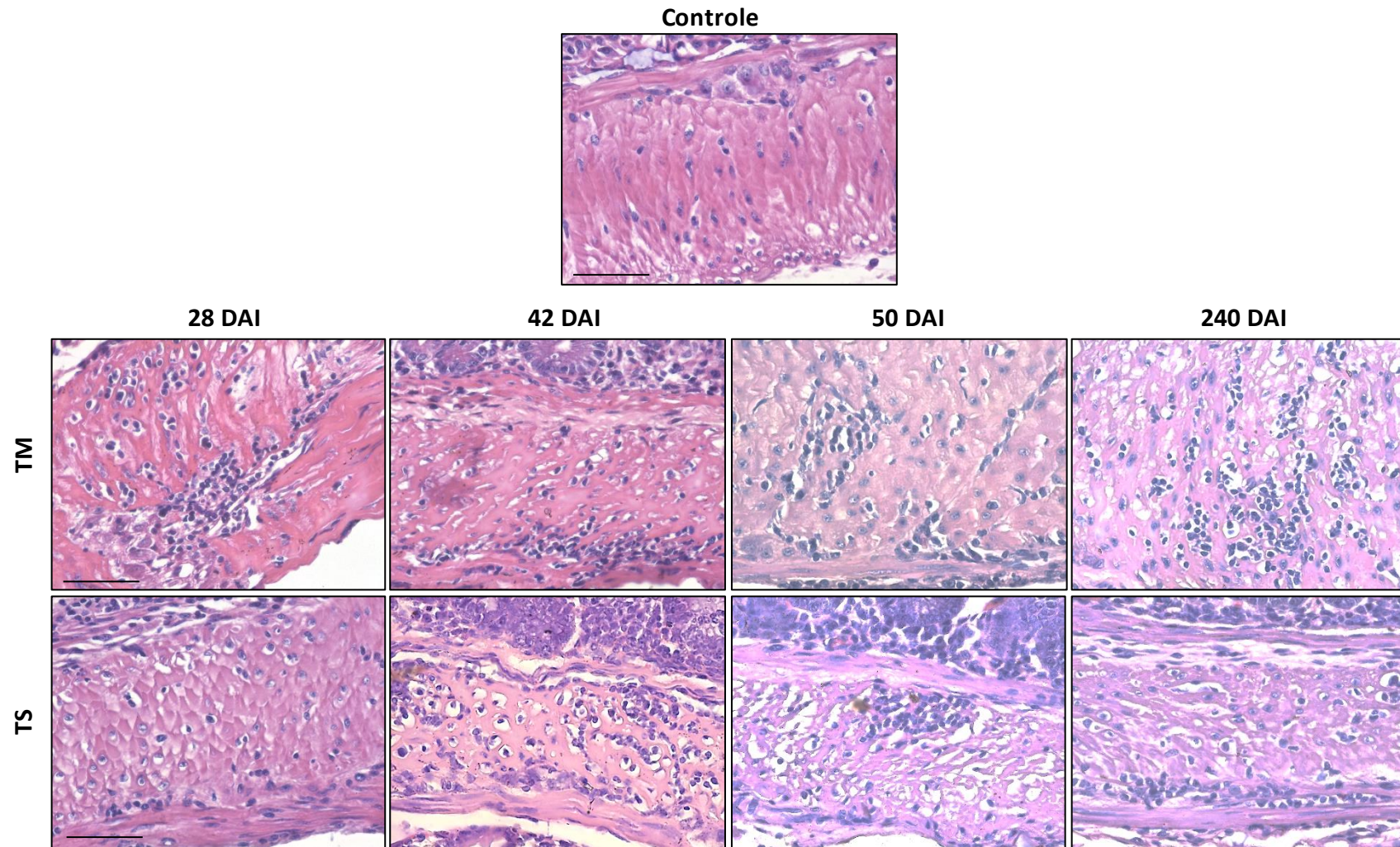


Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos do da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle). Infiltrado inflamatório moderado em 28, 42, 50 e 240 dias após a infecção no grupo TM; e infiltrado discreto aos 28 e 240 dias após a infecção e moderado nos 42º e 50º dia no grupo TS. Hematoxilina-Eosina. Barra=50µm. DAI: dias após a infecção.

5.6 Quantificação da neoformação de colágeno

O impacto da infecção pelas diferentes formas infectivas do *T. cruzi*, foi verificado sobre as alterações histopatológicas no cólon durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas e os resultados da análise quantitativa e qualitativa da neoformação de colágeno na camada muscular estão apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

Os animais dos grupos TS mostraram área de fibrose significativamente maior quando comparado aos animais do grupo controle que apresentaram aspecto histológico normal, nos dias 180 e 240 após infecção.

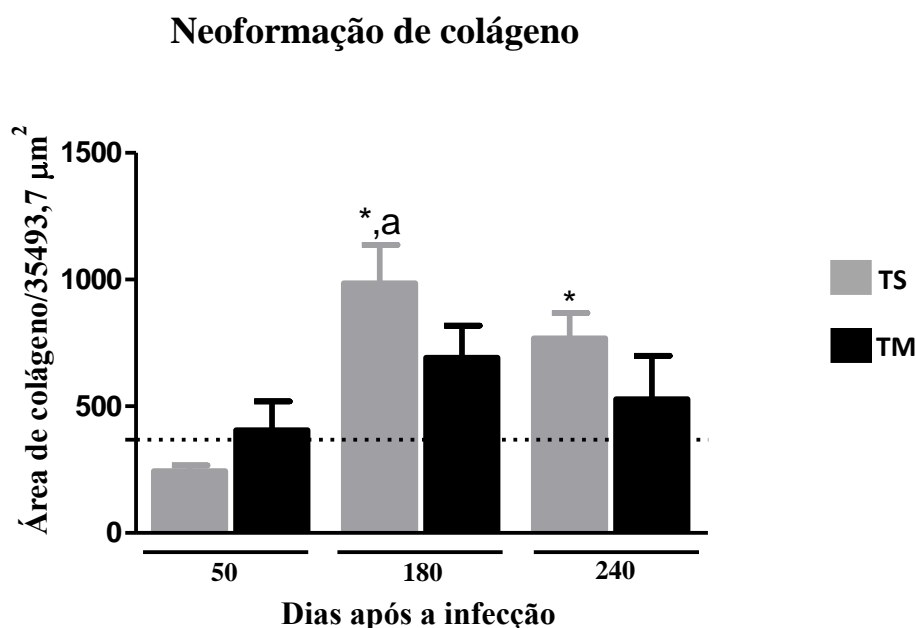


Figura 9: Quantificação da área de neoformação de colágeno na camada muscular do cólon de camundongos infectados por formas TS (■) ou TM (■) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* avaliados nas fases aguda e crônica da infecção. A linha tracejada representa a média da área de colágeno em cortes histológicos de animais não infectados (n=42). “*” representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais não infectados. “a” representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao 50 DAI nos animais do grupo TS. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão de seis camundongos por grupo em cada tempo.

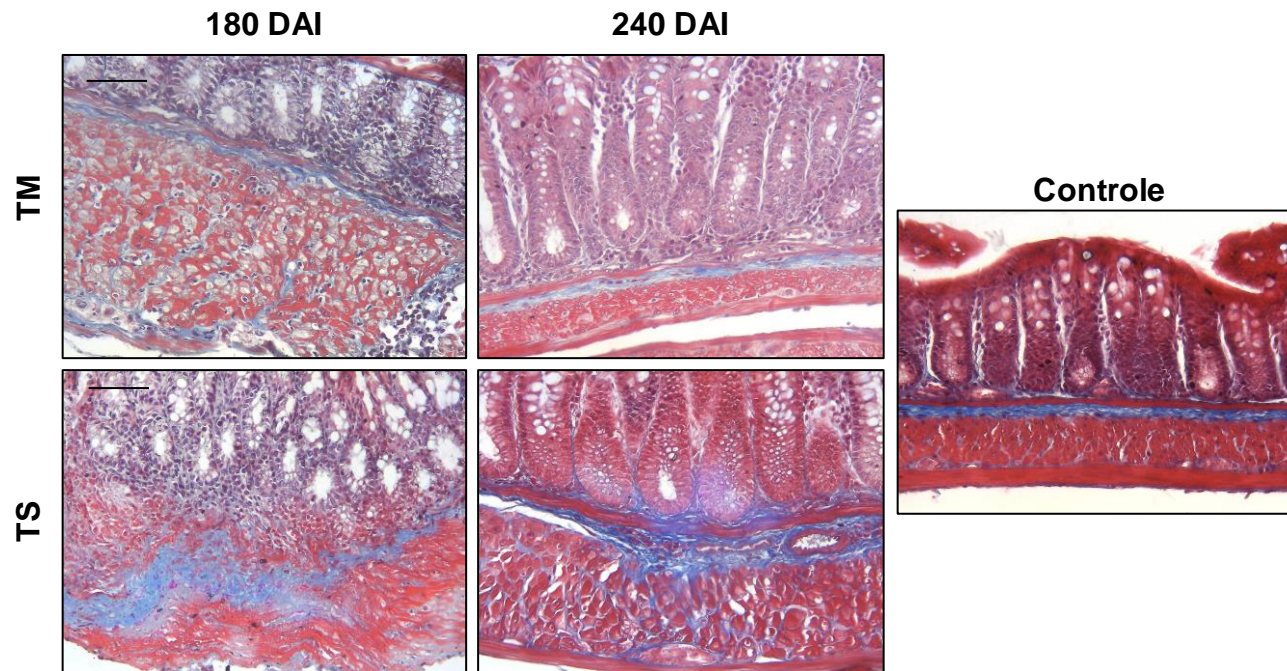


Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. Aspecto histológico muscular normal em animais não-infectados (Controle). Discreta neoformação de colágeno aos 180 e 240 dias após a infecção nos animais do grupo TM. Intensa e moderada fibrose aos 180 e 240 DAI, respectivamente. Tricrômico de Masson. Barra=50µm. DAI: dias após a infecção.

5.7 Plexo de Auerbach – Análise da área PGP 9.5 imunomarcada

O impacto da infecção pelas diferentes formas infectivas do *T. cruzi*, foi verificado sobre a inervação mioentérica no cólon durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas e os resultados da análise quantitativa e qualitativa área imunomarcada por PGP9.5 na camada muscular estão apresentados nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

No grupo de animais infectados com formas TS observou-se uma redução significativa da área PGP 9.5 imunomarcada a partir do 50º dai, e que permaneceu até a fase crônica da infecção. Já no grupo de animais infectados com formas TM, essa denervação se iniciou mais precocemente, aos 42 dias após a infecção, e também se manteve na fase crônica.

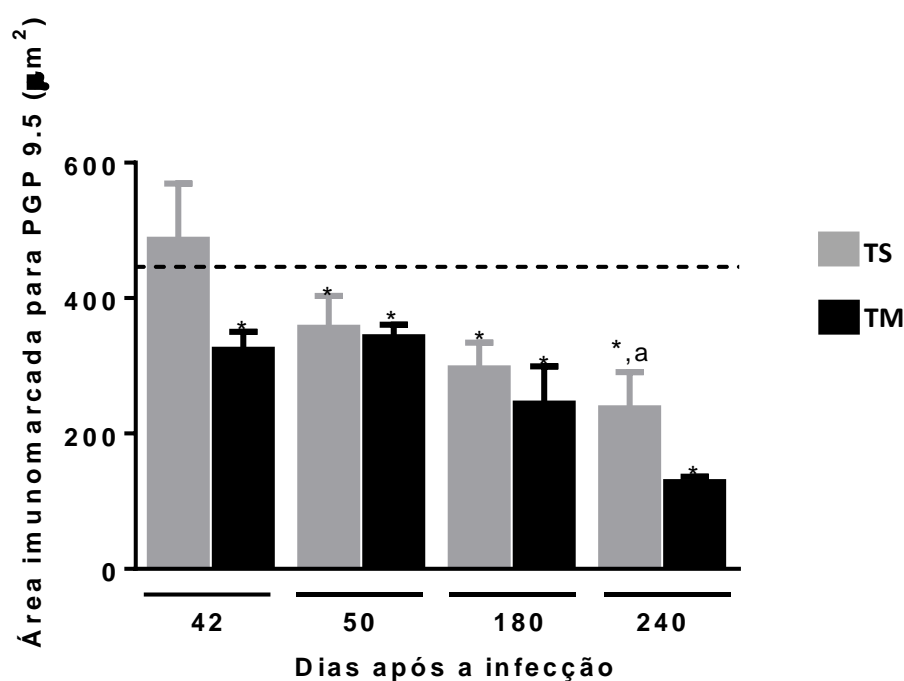


Figura 11: Avaliação morfométrica da área PGP 9.5-IR no cólon de camundongos *Swiss* infectados com formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. A linha tracejada representa a média da área de neurônios imunomarcados com o anticorpo anti-PGP 9.5 em cortes histológicos de animais não infectados (n=42). A letra “a” representa diferença significativa em relação aos dias 42 no grupo TS. “*” indica diferença significativa entre os grupos infectados e o grupo não-infectado. Os valores foram expressos como média ± erro padrão de seis camundongos por grupo em cada tempo.

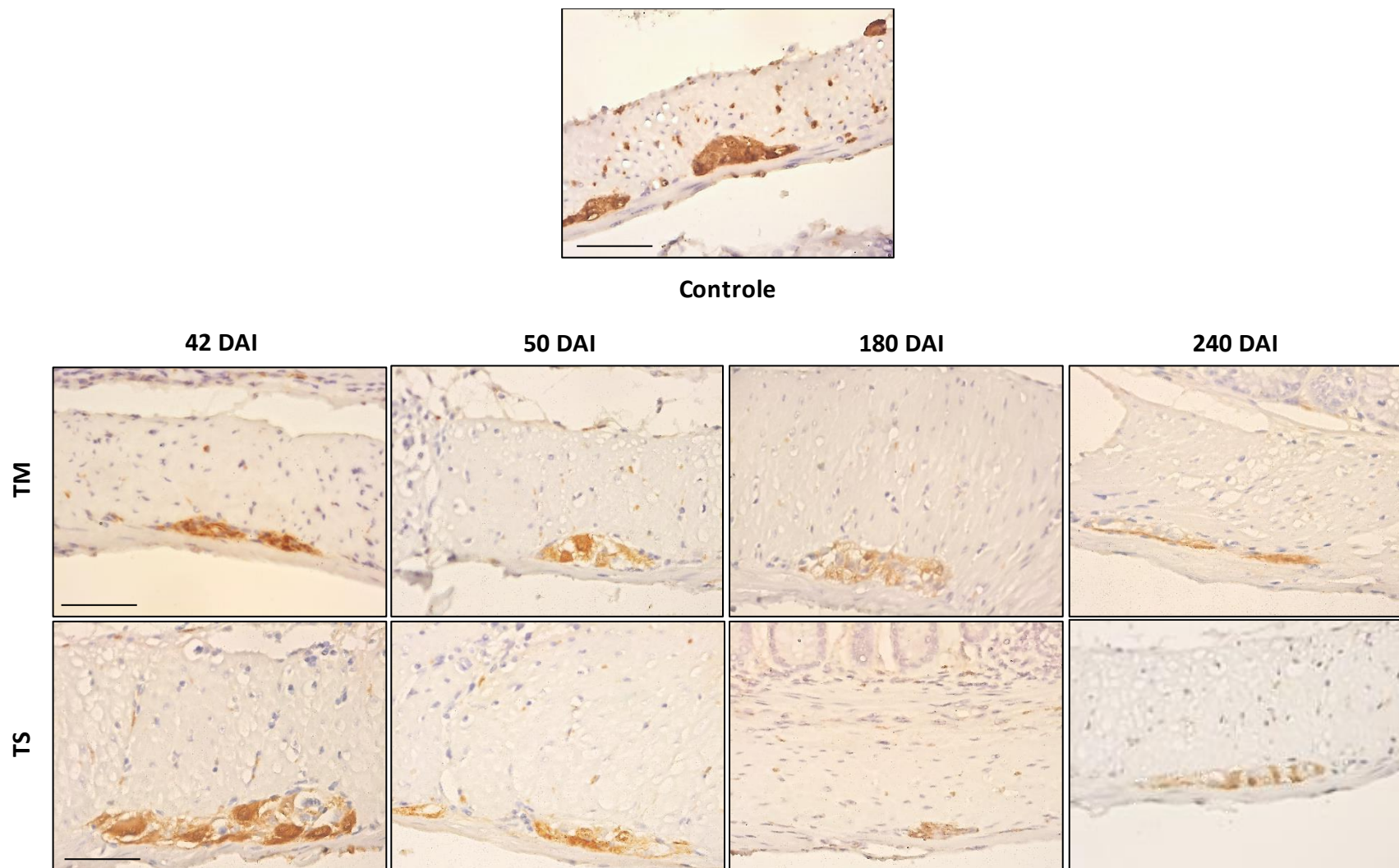


Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos da camada muscular do cólon de camundongos após a infecção com formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi*. Gânglio mioentérico PGP 9.5-IR com aspecto normal em animais não-infectados (Controle). Discreta redução de área imunomarcada aos 42 e 50 dias; moderada aos 180 dias e intensa aos 240 dias após a infecção em animais do grupo TM. Discreta redução de área imunomarcada aos 50 dias e moderada aos 180 e 240 dias após a infecção nos animais do grupo TS. Imuno-histoquímica anti-PGP 9.5. Barra = 50µm. DAI: dias após a infecção.

5.8 Análise das citocinas presentes no cólon

O impacto da infecção pelas diferentes formas infectivas do *T. cruzi*, sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias e imunomoduladoras no cólon durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas foi realizado e os resultados estão apresentados na Figura 13.

Os resultados mostraram que para os animais infectados com formas TM ocorre de maneira geral um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias ao final da fase aguda da infecção (50 DAI) que se estende à fase crônica (180 e 240 DAI) em relação ao grupo de animais não infectados. Esse perfil foi observado para as citocinas IL-6, IL-12, TNF- α . Comparando-se as duas fontes de inóculo observou-se um aumento de IL-6 e IL-12 em 240 DAI no grupo TM em relação ao TS, já para a citocina TNF- α esse aumento só é observado em 180 e 240 DAI.

Em relação à citocina IFN- γ , notou-se aumento significativo em relação ao grupo controle nos dias 14 e 180 no grupo TM e no grupo TS no 50º DAI. Comparando-se os grupos infectados, observou-se um aumento de IFN- γ no 14 DAI no grupo TM relação ao grupo TS.

Para a citocina imunomoduladora IL-10, observou-se um aumento de sua produção apenas para os animais infectados com formas TM nos dias 7, 14, 50, 180 e 240 após a infecção em relação ao grupo de animais não infectados.

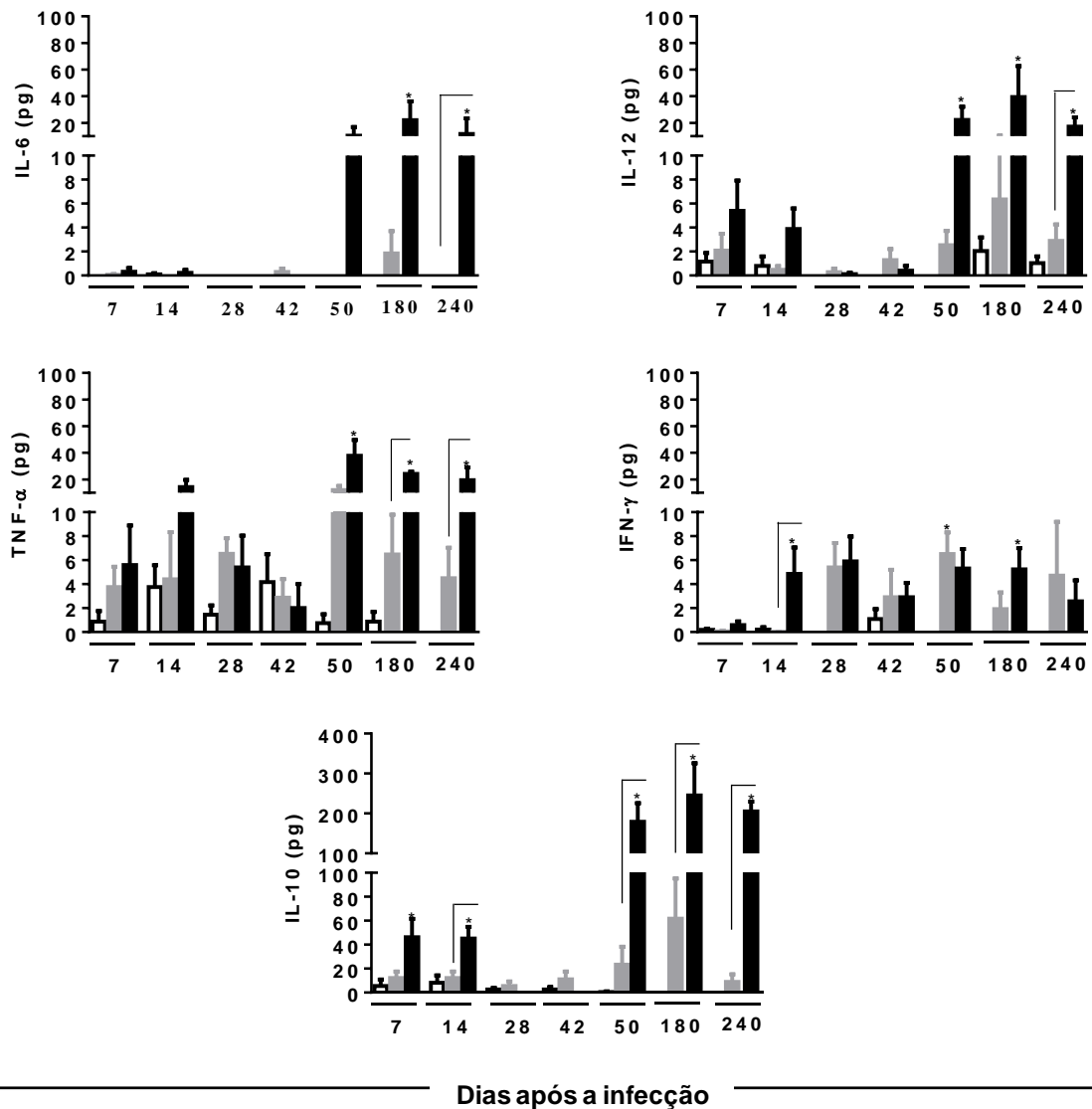


Figura 13: Quantificação das citocinas no cólon de camundongos não infectados (□) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa VL-10 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fases aguda e crônica da infecção. “*” indica diferença significativa entre os grupos infectados e o grupo controle. As linhas conectoras representam diferenças significativas no mesmo período de tempo entre os grupos de animais infectados. Os valores foram expressos como média ± erro padrão de seis camundongos por grupo em cada tempo.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho relata as principais alterações no cólon de camundongos infectados por formas TS ou TM da cepa VL-10 do *T. cruzi*. Apesar de ambas as formas promoverem a infecção, elas possuem distintas moléculas que podem induzir à diferentes respostas imunológicas, tanto *in vitro* (Brener e Gazzinelli, 1997) quanto *in vivo* (Carneiro *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2012). A infecção por formas TM, mimetiza as infecções por vetores e a infecção oral. Já a infecção com formas TS simula as formas de infecção por transplante de órgãos, doação de sangue, transmissão vertical, e ainda, acidentes laboratoriais. Por ser de obtenção e manutenção mais fácil em laboratórios, a maioria dos trabalhos experimentais *in vivo*, utilizam formas TS. Além disso, com o recente aumento de notificações de doença de Chagas em países não endêmicos, onde a infecção ocorre principalmente por transfusão sanguínea, torna-se necessário uma melhor compreensão da interação inicial parasito/hospedeiro e as suas implicações na evolução da doença.

Nesse sentido, uma vez que resultados prévios do nosso grupo de pesquisa não encontraram alterações imunopatológicas no trato digestório de camundongos infectados com as formas TS e TM da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* (Marques, F. S., 2016), tornou-se importante conhecer qual impacto no trato digestório da infecção por uma cepa com conhecido tropismo por fibras musculares, a VL-10, e se a influência das formas infectantes no curso da infecção seria cepa dependente. De acordo com o novo consenso de nomenclatura esta cepa foi classificada como pertencente ao *discrete typing units II* (DTU II) (Zingales *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2010). Esse DTU é encontrado predominantemente nas regiões sul e central da América do Sul e encontra-se associado com manifestações cardíacas bem como síndromes do megacólon e megaesôfago (Santana, 2013).

A taxa de sobrevivência foi diferente entre os grupos infectados, e apenas os animais infectados por formas tripomastigotas metacíclicas apresentaram mortalidade ao longo da infecção (52% de sobrevivência). Esse resultado difere do encontrado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, onde independente da fonte do inóculo, camundongos infectados pela cepa Berenice-78 não apresentaram mortalidade ao longo da infecção (Vieira *et al.*, 2012). Além disso, apesar de nesse trabalho a infecção por ambas as formas infectantes apresentarem um período pré-patente semelhante, animais infectados com formas TM tiveram pico máximo de parasitemia maior que animais infectados com formas TS. Entretanto, tanto Carneiro e colaboradores (2007) quanto Vieira e colaboradores (2012) mostraram que independente do modelo experimental (cães ou

camundongos), a infecção pelas diferentes formas infectivas da cepa Be-78, apresentou maior período pré-patente e menores níveis de parasitemia nos animais infectados pelas formas TM, ou seja, resultado contrário do observado neste trabalho. Assim, pode-se especular que a influência da fonte do inóculo na interação inicial parasito/célula hospedeira e conseqüentemente, no curso da infecção ocorre de forma distinta, sendo dependente da cepa utilizada.

Na fase aguda da doença de Chagas, a infecção pelo *T. cruzi* induz uma forte ativação tanto da resposta imune inata, quanto da resposta imune adaptativa. Uma das melhores formas de se avaliar o comportamento da resposta imune é o conhecimento sobre as populações celulares presentes no sangue periférico, pois permite acompanhar a evolução da doença ao longo do tempo. No caso da doença de Chagas, este acompanhamento permite compreender os múltiplos fatores relacionados ao curso da doença, possibilitando a elaboração de hipóteses que expliquem os mecanismos envolvidos na amplificação/manutenção de determinadas lesões.

Assim, neste presente estudo foi realizada a imunofenotipagem do sangue periférico para avaliar qual o impacto da infecção por formas sanguíneas ou metacíclicas ao longo das fases aguda e crônica da doença. Considera-se que para um controle eficaz do parasito seja requerido anticorpos anti-*T. cruzi* e macrófagos ativados (Kumar e Tarleton, 1998). Nos estágios iniciais da doença é observado um aumento na presença de macrófagos e células NK, seguido de uma ativação policlonal de linfócitos B e linfócitos T, além de hipergamaglobulinemia (Minoprio *et al.*, 1987).

Uma das primeiras células a serem ativadas na resposta imune são os monócitos cuja principal via de ação é se transformar em macrófagos ao migrarem para os tecidos. Os macrófagos reconhecem o *T. cruzi* por meio de receptores do tipo Toll-Like e uma vez estimulados por antígenos derivados de formas tripomastigotas e amastigotas do *T. cruzi*, mas não de tripomastigotas metacíclicas, podem atuar como células efetoras para uma atividade parasiticida, com produção de metabólitos reativos de nitrogênio e oxigênio e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α (Camargo *et al.*, 1997). Citocinas como IL-12 e TNF- α levam à ativação de células de NK, que passam a produzir IFN- γ . Dessa forma, células NK são a primeira fonte de IFN- γ . antes do desenvolvimento da resposta mediada por células T. Além disso, IL-12 e TNF- α facilitam a polarização de células TCD4⁺ e a resposta de TCD8⁺ ao IFN- γ (Brenner e Gazzinelli, 1997).

Além disso, sugere-se que o trato digestório influencie na ativação de macrófagos já que é uma região rica em células dendríticas e em macrófagos que poderiam favorecer o ambiente de quimio-atração. Foi observado um aumento de monócitos no sangue periférico de camundongos infectados com formas TM durante a fase aguda da doença. Entretanto, esse aumento de monócitos no sangue periférico não foi associado ao aumento de citocinas pró-inflamatórias no colón desses animais, sendo observado diferença significativa apenas na produção de IFN- γ no 14^o DAI, sem aumento de IL-12 e TNF- α , que são citocinas diretamente ligadas a ativação de macrófagos. Talvez os maiores níveis de IFN- γ observado no início da infecção favoreçam a migração dessa célula ao cólon. Nesse sentido, poderia se hipotetizar que os monócitos poderiam estar migrando para o colón, porém não estariam sendo ativados devido à grande produção de IL-10 presente nos animais do grupo TM.

Em relação aos linfócitos TCD4⁺ esses encontram-se diminuídos no sangue periférico dos animais infectados com formas TS ou TM durante a fase aguda, entretanto essa redução é mais precoce no grupo TM. Esse fato poderia ter como causa sua migração para os órgãos alvos da doença, já que nesse grupo foi observado um intenso processo inflamatório na fase aguda da doença já no 28^o dia após a infecção. Além disso, um estudo realizado por Lemos e colaboradores (1998) mostrou que no sangue periférico de pacientes chagásicos que apresentavam a forma digestiva grave da doença era observado uma redução significativa de linfócitos TCD4⁺ circulantes em relação aos indivíduos não infectados ou àqueles que se encontravam na fase inicial da doença, não sendo observada diferença significativa na população de células CD8⁺ entre os grupos avaliados.

Células TCD4⁺ tem ação indireta na imunopatogênese da doença de Chagas. Já foi demonstrado que no coração permanece por um breve período, sendo logo substituída por linfócitos TCD8⁺. Além disso, possui papéis variados na resistência ao *T. cruzi*: (1) contribui como fonte de IFN- γ para ativação de macrófagos; (2) atua na ativação e diferenciação de TCD8⁺ por meio da produção de IL-12 e IFN- γ . A importância da participação de células TCD4⁺ na imunopatogênese ficou comprovada em um estudo, onde a função das linfócitos TCD8⁺ é bloqueada pela depleção de células TCD4⁺ (Brenner e Gazzinelli, 1997).

Outra hipótese para a redução de células TCD4⁺ ainda na fase aguda seria à morte celular por apoptose no baço e nos linfonodos (Lopes *et al.*, 1999). A infecção pelo *T. cruzi* leva à uma ativação policlonal de células B (Minoprio *et al.*, 1989), que por si só

induz apoptose (Chaves *et al.*, 2016; Longhi *et al.*, 2014). Além disso, antígenos liberados pelo parasito como transialidasas e HSP70, também induz a morte programada das células (Leguizamón *et al.*, 1999; Maranon *et al.*, 2000). Dessa forma o *T. cruzi* utiliza mecanismos que induzem a apoptose para evadir do sistema imune do hospedeiro.

Essa indução de células T à apoptose em chagásicos se correlaciona com o microambiente rico em citocinas. Sabe-se que TNF- α é a citocina mais envolvida na via de apoptose (Reis *et al.*, 1993). Chaves e colaboradores (2016) sugerem que as células T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com a forma cardíaca que expressam TNF- α são altamente suscetíveis a sofrer apoptose após estimulação *in vitro*. No presente trabalho foi observado aumento da produção de TNF- α no cólon dos animais infectados com formas TM na fase crônica da doença, sugerindo uma participação dessa citocina na redução de células TCD4⁺ na fase crônica observada nesse grupo.

Quanto aos linfócitos TCD8⁺ este trabalho mostrou que houve um aumento dessa população celular no sangue periférico em ambos os grupos infectados, sendo maior naqueles animais infectados por formas TM. Da Silveira e colaboradores (2007) mostraram que pacientes chagásicos com ou sem megacólon apresentaram um aumento de linfócitos T CD8⁺ nos plexos submucoso e mioentérico e também na camada muscular do cólon. Além disso, sabe-se também que os linfócitos T CD8⁺ são as principais células responsáveis pelo controle do *T. cruzi*, uma vez que camundongos nocaute para essas células são incapazes de sobreviverem à infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 1994). Além de estar envolvido na resistência na infecção pelo *T. cruzi* é a subpopulação de células T mais encontrada no tecido cardíaco na fase crônica da doença de Chagas, sendo as principais células responsáveis pela imunopatogênese na doença de Chagas (De Lourdes Higuchi *et al.*, 1997). Podemos sugerir então, que o aumento de células TCD8⁺ no sangue periférico ocorre na tentativa de reduzir o parasitismo tecidual. E que independente da fonte do inóculo, a infecção pelo *T. cruzi* induz ao estabelecimento de uma resposta efetora de linfócitos T CD8⁺, sendo mais intensa no grupo TM, o que poderia estar correlacionado ao menor período patente observado nesse grupo, devido ao controle do parasitismo tecidual por essas células.

Um estudo realizado em pacientes com megacólon mostrou que a maioria das células inflamatórias presentes nos plexos de Auerbach e Meissner eram linfócitos T, sendo que linfócitos TCD8⁺ correspondiam a mais da metade da população linfocitária. A presença dessas células nos dois plexos foi relacionada à degeneração dos gânglios celulares desses pacientes (Corbett *et al.*, 2001). Além disso, Da Silveira e colaboradores

em 2007 mostraram que linfócitos TCD8⁺ em lesões digestivas expressavam moléculas citolíticas, como granzima ou o antígeno TIA-1. No presente trabalho observou-se que independente da fonte do inóculo houve aumento da produção de células CD8⁺ na fase aguda da doença e este fato pode estar relacionado a perda neuronal observado nos dois grupos de animais infectados ainda na fase aguda da doença. No grupo TM esse aumento foi maior que em TS ao final da fase aguda, o que justificaria o processo de denervação mais precoce para este grupo.

Além disso, apesar de ter sido observada redução neuronal ainda na fase aguda em ambos os grupos infectados, essa se inicia mais precocemente nos animais infectados com formas TM e poderia ser o resultado de uma produção elevada de IFN- γ no 14^o DAI que estaria relacionada à uma elevada produção de NO pelos macrófagos. Arantes e colaboradores (2004) também demonstraram a participação de NO na destruição neuronal de camundongos ainda na fase aguda da doença. Neste estudo foram utilizados camundongos wild-type (WT), camundongos nocaute para IFN- γ e camundongos nocaute para iNOS. Foi observada redução no número de neurônios do plexo mioentérico e redução no número de neurônios e fibras positivas para PGP 9.5 nos animais WT em relação aos animais não infectados. Também foi observado lesões acentuadas nos gânglios mioentérico dos animais WT e esses danos foram correlacionados à perda da expressão de PGP, o que ocasionou a morte celular. Esses achados não foram observados nos animais nocaute. A indução de iNOS foi significativamente maior nos animais WT em relação ao grupo controle. Nos animais nocaute para iNOS, mesmo com aumento do número de ninhos de amastigotas e processo inflamatório na parede intestinal, não foi observado redução no número de neurônios do plexo mioentérico. Nos animais nocaute para IFN- γ não foi observado nem processo inflamatório, nem morte neuronal, sugerindo que o NO pode ser o principal mediador na lesão neural.

De Almeida-Leite e colaboradores (2007) ao avaliarem cultura de neurônios mostraram que quando esses foram incubados com *T. cruzi*, IFN- γ , e macrófagos resultava em morte neuronal em relação à cultura com apenas neurônios. Além disso foi observado envelhecimento dos núcleos celulares, irregularidade de membrana associada à núcleos picnóticos, presença de núcleos apoptóticos, alterações neuronais necróticas e degenerativas caracterizadas por vacuolização celular e núcleos entumecidos, dissolução citoplasmática e presença de restos celulares. Neste trabalho também foi avaliado a produção de NO e sua possível correlação com a morte neuronal. Foi observado um

aumento na produção de NO quando os neurônios foram incubados com *T. cruzi*, IFN- γ , e macrófagos, mas não quando cada elemento foi adicionado separadamente à cultura celular. Além disso houve produção da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos macrófagos infectados. Por último foi avaliado se a morte neuronal mediada por macrófagos requeria a atividade de iNOS. Foram avaliados macrófagos de camundongos nocaute para iNOS. Os resultados mostraram que a infecção de macrófagos deficientes de iNOS não causaram morte neuronal, sugerindo que a produção de NO por macrófagos ativado pelo IFN- γ é o principal mecanismo responsável pela morte neuronal.

Anticorpos específicos possuem papel fundamental da defesa contra o *T. cruzi*, desempenhando atividade efetora contra formas sanguíneas ou teciduais (Alcantara e Brener, 1978). Estudos utilizando camundongos infectados pelo *T. cruzi* mostraram que ocorre ativação de LB ainda na fase aguda da doença (Minoprio *et al.*, 1989). Outro estudo conduzido por Cardillo e colaboradores em 2007 mostraram que camundongos nocaute para células B apresentaram redução da quantidade de citocinas inflamatórias e de linfócitos TCD8⁺ ativados no infiltrado inflamatório cardíaco. Nesse sentido, no nosso trabalho só foi observado aumento das citocinas inflamatórias quando os níveis desse linfócito voltaram ao normal, podendo-se especular um papel direto na produção de citocinas inflamatórias e linfócitos B nos animais do grupo TM.

A dosagem de citocinas pela técnica *Cytometric Bead array* mostrou no geral que nos animais infectados com formas TM houve um aumento da produção citocinas pró-inflamatórias na fase crônica da doença, com exceção do IFN- γ . Esse aumento foi inesperado uma vez que se espera que na fase crônica já tenha ocorrido controle do parasitismo e do processo inflamatório. Um estudo conduzido por Cardillo e colaboradores (1996), mostrou que até 8 dias após infecção pelo *T. cruzi* não há resposta imune célula T específica, sendo células NK a principal fonte de IFN- γ . Essa citocina atua limitando replicação parasitária na fase inicial da infecção, através da ativação do macrófago e da óxido nítrico sintase, ou age limitando a diferenciação de células no subtipo Th2 o que provoca uma diminuição nos níveis de IL-10 secretados.

O papel da citocina pró-inflamatória IL-6 também foi avalizada nesse trabalho. Em conjunto com a proteína C reativa, está associada à lesão do miocárdio na infecção pelo *T. cruzi* (Cardoni, 1997). A IL-17 é uma citocina chave na indução do processo inflamatório, orquestrando uma organizada produção de citocinas inflamatórias como a IL-6, TNF- α , e GM-CSF, além de induzir a migração de neutrófilos para os focos de

infecção. Já foi demonstrado que camundongos nocaute para IL-17 apresentaram falência múltipla de órgãos, redução da expressão de citocinas como IFN- γ , IL-6 e TNF- α em relação à camundongos selvagens. Dessa forma, pode-se inferir que a ativação eficiente de células relacionadas ao sistema imune para eliminação da infecção causada pelo *T. cruzi*, foi prejudicada pela ausência de IL-17, resultando na maior susceptibilidade dos camundongos à infecção (Miyazaki *et al.*, 2010). Logo, uma alta expressão de IL-6 nos camundongos infectados com formas TM na fase crônica da doença de Chagas pode estar relacionada com o processo inflamatório e as lesões no cólon desses animais.

Os dados apresentados neste trabalho para imunofenotipagem do sangue periférico em conjunto com os dados de dosagem de citocinas, no cólon, sugerem que nos animais infectados com formas TM há uma intensa ativação de células do sistema imune ainda na fase aguda da doença na tentativa de eliminação do parasito. No entanto, na fase crônica da doença, ocorre produção de citocinas responsáveis pela resistência à infecção, mas que também estão associadas ao dano tecidual, podendo ser correlacionada com a manutenção do processo inflamatório no cólon de animais infectados com essas formas já na fase crônica da doença.

A doença de Chagas é caracterizada por possuir duas fases clinicamente distintas. A fase aguda inicial geralmente apresenta sinais e sintomas inespecíficos (Kirchhoff, 1993). No entanto, pacientes infectados pela via vetorial também podem apresentar sinais de porta de entrada do parasito. Quando a porta de entrada é o olho, recebe o nome de sinal de Romaña que se caracteriza por edema unilateral bipalpebral. Quando o parasito penetra a pele do hospedeiro recebe o nome de chagoma de inoculação (Teixeira *et al.*, 2002). Também é característico da fase aguda altos níveis de parasitemia e elevado parasitismo tecidual (Andrade e Andrews, 2005). Quando não há cura/óbito o indivíduo evolui para forma crônica que é caracterizada por uma redução de parasitos circulantes e do parasitismo, com conseqüente redução da atividade inflamatória. No entanto, se o organismo falha nesse controle, o paciente pode desenvolver as manifestações graves da doença de Chagas na fase crônica, com comprometimento do coração, do trato digestório ou ainda, uma associação entre os dois (Tafuri *et al.*, 1971).

Embora alguns estudos apontem autoimunidade como sendo a causa da patogênese crônica na doença de Chagas, alguns trabalhos recentes em camundongos e humanos, apontam uma associação positiva entre parasitismo tecidual, inflamação e a gravidade da doença (Borges *et al.*, 2013; Lemos *et al.*, 2013). Os dados encontrados no

presente trabalho de parasitismo tecidual, infiltrado inflamatório e a avaliação da área imunomarcada de neurônios corroboram com essa hipótese.

Para avaliar o impacto da infecção por formas TS ou TM do *T. cruzi* no parasitismo tecidual, foi quantificado a carga parasitária no cólon. Os resultados mostraram que os animais infectados com as formas TM apresentaram maior carga tecidual de parasitos na fase aguda da doença em relação aos os animais infectados com formas TS. Esse elevado parasitismo tecidual pode estar relacionado com uma intensa ativação do sistema imune e manutenção do processo inflamatório na fase crônica da doença (Marinho *et al.*, 1999). Além disso, Schlemper e colaboradores (1983) mostraram que o acometimento do miocárdio em camundongos cronicamente infectados parece ser consequência do parasitismo e da inflamação durante os primeiros estágios da doença. Um outro estudo conduzido por (Lages-Silva *et al.*, 2001) e colaboradores em 2001 mostrou a presença de elevado parasitismo tecidual e processo inflamatório no esôfago de indivíduos com a patologia digestiva.

Resultados do processo inflamatório mostraram que apesar de ter havido aumento dos processo inflamatório em ambos os grupos infectados na fase aguda da doença, nos animais infectados com formas TM houve manutenção do processo inflamatório na fase crônica da doença, que pode estar correlacionado com a forte ativação do sistema imune ainda na fase aguda, devido à alta carga parasitária neste grupo. Corbett e colaboradores (2001) encontram no cólon de pacientes com a síndrome digestiva discreto infiltrado inflamatório mononuclear nos gânglios parassimpáticos e nos plexos de Auerbach e Meissner, além de inflamação focal discreta na camada muscular. Somando-se a isso a lesão dos plexos intramurais foi associado ao processo inflamatório crônico. Em outro estudo conduzido por Da Silveira e colaboradores (2007), foi observado em pacientes com megacólon necrose de células ganglionares, além de processo inflamatório e fibrose nos plexos mioentérico e submucoso. Também foi observado processo inflamatório discreto de células mononucleares em torno de células ganglionares degeneradas.

Da Silveira e colaboradores (2005), fizeram uma análise comparativa entre a presença de kDNA, processo inflamatório e denervação em pacientes chagásicos com ou sem megacólon. Resultados revelaram que pacientes com a forma digestiva da doença apresentaram contagem neuronal que variou de 0 a 4 neurônios/980 µm de tecido, enquanto que nos pacientes não infectados essa frequência foi de 347 a 459 neurônios/980

um de tecido. Nos pacientes chagásicos sem megaesôfago essa contagem sofreu grandes variações, logo os pacientes foram subdivididos em dois novos grupos: Ila pacientes com contagem neuronal que variou de 196 a 351; grupo I Ib indivíduos com contagem neuronal entre 20 a 46 neurônios. Curiosamente no grupo Ila não foi observado processo inflamatório, enquanto que no grupo I Ib observou-se infiltrado inflamatório discreto de células mononucleares. Nos pacientes portadores do megaesôfago foi observado processo inflamatório focal e difuso, composto principalmente de células mononucleares. Também foi observado ganglionite, periganglionite e vasculite.

A análise de cortes de esôfagos imunocorados com CD54 mAB e anti-TIA-1 mAB revelou a presença de células NK e linfócitos citotóxicos no plexo mioentérico do esôfago de pacientes com mega e no subgrupo I Ib de pacientes chagásicos sem megaesôfago, sendo que a frequência dessas células no primeiro grupo foi maior. A análise das imagens de secções coradas com CD68⁺ revelou que a presença de macrófagos no plexo mioentérico do esôfago está correlacionado com o desenvolvimento da doença. Nesse sentido, esses dados sugerem que a infecção por formas TM está associada à manutenção do processo inflamatório, e conseqüentemente às lesões encontras na forma digestiva da doença de Chagas.

Somando-se a esses achados estão os resultados encontrados para área de neurônios imunomarcadas por PGP 9.5, no qual animais infectados com formas TM apresentam diminuição da área neuronal mais precocemente do que animais infectados com formas TS. Da Silveira e colaboradores (2007) mostraram pacientes com megacólon apresentaram fibras nervosas mais finas, o que implica em perda de axônios dos feixes de fibras nervosas no músculo. Além disso, a análise morfométrica na área imunomarcada por PGP 9.5 mostrou redução da área das fibras nervosas em indivíduos com megacólon. Sabe-se que na fase aguda da doença a destruição neuronal está associada a elevada carga parasitária no tecido, e na fase crônica pode ser em consequência da ação do sistema imune. Esses dados corroboram com este trabalho, uma vez que animais infectados com formas TM apresentam maior parasitismo tecidual na fase aguda, do que animais infectados com formas TS, além de produção de mediadores pró-inflamatórios na fase crônica da doença.

Além disso, a interação inicial entre as células do hospedeiro e o *T. cruzi* são críticas para o controle da parasitemia, e para o estabelecimento de um microambiente rico em

citocinas que irá direcionar o desenvolvimento e posterior regulação das células T efetoras, conhecidas por serem importantes no estabelecimento da doença durante a fase crônica.

7. CONCLUSÃO

Esses resultados mostram que a interação inicial entre formas tripomastigotas metacíclicas e o hospedeiro vertebrado induz um perfil de resposta imunológica diferente daquele observada na infecção com formas tripomastigotas sanguíneas, sendo que a infecção por formas tripomastigotas metacíclicas promove um elevado parasitismo na fase aguda, provocando uma exacerbada ativação do sistema imune, que pode estar relacionado com uma precoce denervação do plexo mioentérico no cólon e também pode ser o responsável pela manutenção do processo inflamatório na fase crônica da doença.

8. REFERÊNCIAS

ABALO, M. et al. Tracing Of One Year Of Chagas Screening At The Centro De Transfusion De Galicia (ctg). Concerning A Positive Blood Donor: P-235. **Vox Sanguinis**, v. 93, p. 140, 2007. ISSN 0042-9007.

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Experimental parasitology**, v. 84, n. 2, p. 231-244, 1996. ISSN 0014-4894.

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. The in vitro interaction of Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta tropica**, v. 35, n. 3, p. 209-219, 1978. ISSN 0001-706X.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Opinion: the Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819, 2005a. ISSN 1740-1526.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 5, p. e52-e54, 2009. ISSN 1537-6591.

BORGES, D. C. et al. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental T trypanosoma cruzi infection. **Immunology**, v. 138, n. 2, p. 145-156, 2013. ISSN 0019-2805.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, n. 6, p. 389-96, 1962. ISSN 0036-4665.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological Control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International archives of allergy and immunology**, v. 114, n. 2, p. 103-110, 1997. ISSN 1018-2438.

BRENNER, Z.; GAZZINELLI, R. Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' dis-ease. **Int. Arch. Allergy Immunol**, v. 114, p. 103-110, 1997.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. A 120-kDa alkaline peptidase from Trypanosoma cruzi is involved in the generation of a novel Ca²⁺-signaling factor for mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5172-5180, 1995. ISSN 0021-9258.

BURLEIGH, B. A. et al. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. **The Journal of cell biology**, v. 136, n. 3, p. 609-620, 1997. ISSN 0021-9525.

CAMARGO, M. M. et al. 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, p. 5890-5901, 1997. ISSN 0022-1767.

CAMPBELL, D. A.; WESTENBERGER, S. J.; STURM, N. R. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 6, p. 549-562, 2004. ISSN 1566-5240.

CAMPOS, J.; TAFURI, W. Chagas enteropathy. **Gut**, v. 14, n. 11, p. 910, 1973.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-595, 2007. ISSN 0019-2805.

CARDONI, R. Inflammatory response to acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Medicina**, v. 57, n. 2, p. 227-234, 1997. ISSN 0025-7680.

CARNEIRO, C. M. et al. 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. 2, p. 120-129, 2007. ISSN 0001-706X.

CASTRO, E. Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas: iniciativas en Centros de Transfusión de España. **Enf Emerg**, v. 8, n. supl 1, p. 48-50, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909. ISSN 0074-0276.

CHAVES, A. T. et al. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 191, 2016. ISSN 1471-2334.

CORBETT, C. E. et al. Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. **Diseases of the colon & rectum**, v. 44, n. 7, p. 993-998, 2001. ISSN 0012-3706.

COSTA, A. C. D. et al. Trypanosoma cruzi seroprevalence among solid organ donors in Ceará State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 616-621, 2018. ISSN 0037-8682.

COURA, J. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 113-117, 2006. ISSN 0037-8682.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009. ISSN 0074-0276.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_supp, p. S6-S7, 2010. ISSN 0028-0836.

DA SILVEIRA, A. et al. Comparative study of the presence of Trypanosoma cruzi kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. **Parasitology**, v. 131, n. 5, p. 627-634, 2005. ISSN 1469-8161.

DA SILVEIRA, A. B. M. et al. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves, and glial cells. **Human pathology**, v. 38, n. 8, p. 1256-1264, 2007. ISSN 0046-8177.

DE ABREU VIEIRA, P. M. et al. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32912, 2012. ISSN 1932-6203.

DE ALMEIDA-LEITE, C. M. et al. Interferon- γ induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by Trypanosoma cruzi-infected macrophages. **Neurobiology of disease**, v. 25, n. 1, p. 170-178, 2007. ISSN 0969-9961.

DE LOURDES HIGUCHI, M. et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 56, n. 5, p. 485-489, 1997. ISSN 0002-9637.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 2020-2020, 2006. ISSN 0102-311X.

DORN, P. L. et al. Autochthonous transmission of Trypanosoma cruzi, Louisiana. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 605, 2007.

DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 208-218, 2009. ISSN 0074-0276.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 3, p. 734-747, 2012. ISSN 1574-6976.

FERREIRA, V. F. et al. Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: a comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 16, p. 5459-5466, 2006. ISSN 0968-0896.

FREIRE, A. C. et al. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I-O cólon como local de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 319-335, 2006. ISSN 1809-4562.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, v. 115, n. 1, p. 22-27, 2010. ISSN 0001-706X.

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, 2003.

JC, P. D. Natural history of Chagas disease. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 65, n. 4, p. 359-366, 1995. ISSN 0066-782X.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and infection**, v. 12, n. 7, p. 511-517, 2010. ISSN 1286-4579.

KIRCHHOFF, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease)--a tropical disease now in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 9, p. 639-644, 1993. ISSN 0028-4793.

KJOS, S. et al. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 249-256, 2008. ISSN 0304-4017.

KOBERLE, F. Neurotoxin of *Trypanosoma cruzi*. **Zentralblatt für allgemeine Pathologie u. pathologische Anatomie**, v. 95, n. 9-10, p. 468, 1956. ISSN 0044-4030.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite immunology**, v. 20, n. 5, p. 207-216, 1998. ISSN 0141-9838.

KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in parasitology**, v. 6, p. 63-116, 1968. ISSN 0065-308X.

LAGES-SILVA, E. et al. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 435-441, 2001. ISSN 0002-9637.

LEGUIZAMÓN, M. S. et al. trans-Smldase from *Trypanosoma cruzi* Induces Apoptosis in Cells from the Immune System In Vivo. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 4, p. 1398-1402, 1999. ISSN 1537-6613.

LEITE, M.; MOYER, M.; ANDREWS, N. Expression of the mammalian calcium signaling response to *Trypanosoma cruzi* in *Xenopus laevis* oocytes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 92, n. 1, p. 1-13, 1998. ISSN 0166-6851.

LEMOS, J. R. D. et al. Influence of parasite load on renal function in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e71772, 2013. ISSN 1932-6203.

LONGHI, S. A. et al. Cytokine production but lack of proliferation in peripheral blood mononuclear cells from chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients in response to *T. cruzi* ribosomal P proteins. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 6, p. e2906, 2014. ISSN 1935-2735.

LOPES, M. F. et al. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient *gld* mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. **European journal of immunology**, v. 29, n. 1, p. 81-89, 1999. ISSN 0014-2980.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Seminars in immunopathology*, 2012, Springer. p.753-770.

MARANON, C. et al. HSP70 from *Trypanosoma cruzi* is endowed with specific cell proliferation potential leading to apoptosis. **International immunology**, v. 12, n. 12, p. 1685-1693, 2000. ISSN 1460-2377.

MARINHO, C. R. et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infection and immunity**, v. 67, n. 1, p. 308-318, 1999. ISSN 0019-9567.

MARQUES, F. S. Avaliação das lesões do trato digestório na infecção por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas do *Trypanosoma cruzi* em camundongos. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Abi - Farmácia) - Universidade Federal de Ouro Preto.

MILES, M. A. New world trypanosomiasis. **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**, 1998. ISSN 0470688610.

MINOPRIO, P. et al. Suppression of polyclonal antibody production in Trypanosoma cruzi-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 2, p. 545-550, 1987. ISSN 0022-1767.

MINOPRIO, P. et al. Immunobiology of Murine T Cruzi Infection: The Predominance of Parasite-nonspecific Responses and the Activation of TCRIT Cells. **Immunological reviews**, v. 112, n. 1, p. 183-207, 1989. ISSN 0105-2896.

MIYAZAKI, Y. et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase Trypanosoma cruzi infection. **The Journal of Immunology**, p. 0900047, 2010. ISSN 0022-1767.

MORENO, M. et al. Trypanosoma cruzi benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918-924, 2010. ISSN 0074-0276.

NUNES, M. C. P. et al. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 12, p. e169-e209, 2018. ISSN 0009-7322.

PRATA, A. Evolution of the clinical and epidemiological knowledge about Chagas disease 90 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 81-88, 1999. ISSN 0074-0276.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001. ISSN 1473-3099.

RAMIREZ, M. I. et al. 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. ISSN 0019-9567.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010. ISSN 0140-6736.

REIS, D. D. A. et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 48, n. 5, p. 637-644, 1993. ISSN 0002-9637.

REIS, D. D. Á. et al. Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 177-178, 2001. ISSN 1878-3503.

REZENDE, J. M.; LUQUETTI, A. O. Chagasic megavisceras. In: (Ed.). **Chagas' disease and the nervous system**: Pan American Health Organization, Washington, DC, 1994. p.149-171.

SANTANA, R. A. G. MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS INFECCIOSAS.

SCHMUNIS, G. Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, v. 31, n. 6, p. 547-557, 1991. ISSN 1537-2995.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-86, 2007. ISSN 0074-0276.

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, 2010. ISSN 0001-706X.

SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P. Chagas disease vector control in Central America. **Parasitology Today**, v. 13, n. 4, p. 141, 1997. ISSN 0169-4758.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. 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, 1991. ISSN 0036-4665.

SHRESTA, S. et al. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? **Current opinion in immunology**, v. 10, n. 5, p. 581-587, 1998. ISSN 0952-7915.

SILVA, M. B. A. et al. VIGILÂNCIA ENTOMOLOGICA DOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS NO AGRESTE PERNAMBUCANO. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 7, p. 229-244, 2017. ISSN 2316-2864.

STEINKAMP, M. et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 124, n. 7, p. 1748-1757, 2003. ISSN 0016-5085.

STIMPERT, K. K.; MONTGOMERY, S. P. Physician awareness of Chagas disease, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 5, p. 871, 2010.

TAFURI, W. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 19, n. 3, p. 405-417, 1970. ISSN 0002-9637.

TAFURI, W. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis. **Virchows Archiv A**, v. 354, n. 2, p. 136-149, 1971. ISSN 0174-7398.

TAFURI, W.; BRENER, Z. Injuries of Meissner and Auerback plexus of albino mice intestines in the chronic phase of experimental trypanosomiasis cruzi. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 9, n. 3, p. 149-154, 1967. ISSN 0036-4665.

TAFURI, W.; MARIA, T.; LOPES, E. Lesões do plexo mioentérico do esôfago, do jejuno e do colo de chagásicos crônicos. Estudo ao microscópio eletrônico. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 13, n. 2, p. 76-91, 1971. ISSN 0036-4665.

TAFURI, W. L. Patogenia da doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 4, p. 194-199, 1987. ISSN 0036-4665.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 550-554, 2001. ISSN 0020-7519.

TARLETON, R. L. et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infection and immunity**, v. 62, n. 5, p. 1820-1829, 1994. ISSN 0019-9567.

TEIXEIRA, A. R.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006. ISSN 0074-0276.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 6, p. 262-265, 2002. ISSN 1471-4922.

TODOROV, A. G. et al. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by Trypanosoma cruzi infection. **Journal of Biological Chemistry**, 2000. ISSN 0021-9258.

TYLER, K.; ENGMAN, D. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001. ISSN 0020-7519.

VAIDIAN, A. K.; WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. Chagas' disease and AIDS. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 3, n. 1, p. 2, 2004. ISSN 1475-9292.

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron glia biology**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2010. ISSN 1741-0533.

YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 1, p. 87-111, 2006. ISSN 0001-3765.

YOSHIDA, N. et al. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 3, p. 269-278, 2000. ISSN 0100-879X.

YOUNG, C. et al. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, v. 47, n. 3, p. 540-544, 2007. ISSN 1537-2995.

ZAMBRANO-VILLA, S. et al. How protozoan parasites evade the immune response. **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 272-278, 2002. ISSN 1471-4922.

ZINGALES, B. et al. 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. 1051-1054, 2009. ISSN 0074-0276.