

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

**Efeito do polimorfismo biológico e molecular do
Trypanosoma cruzi sobre a resposta imune e as alterações
teciduais no coração e cólon de camundongos na fase
crônica da infecção**

Thays Helena Chaves Duarte

Ouro Preto, 2020

Thays Helena Chaves Duarte

**Efeito do polimorfismo biológico e molecular do
Trypanosoma cruzi sobre a resposta imune e as alterações
teciduais no coração e cólon de camundongos ao longo da
fase crônica da infecção**

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
Co-orientadora: Dra. Nivia Carolina Nogueira de Paiva

Ouro Preto, 2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

D812e Duarte, Thays Helena Chaves .

Efeito do polimorfismo biológico e molecular do *Trypanosoma cruzi* sobre a resposta imune e as alterações teciduais no coração e cólon de camundongos na fase crônica da infecção . [manuscrito] / Thays Helena Chaves Duarte. - 2020.

76 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Paula Melo de Abreu Vieira.

Coorientadora: Dra. Nivia Carolina Nogueira de Paiva.

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

Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Poliformismo (Genética). 3. Chagas, Doença de. 4. Moléculas. I. Paiva, Nivia Carolina Nogueira de. II. Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 616.99

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6 1589



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 10 dias do mês de fevereiro do ano de 2020, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Thays Helena Chaves Duarte, sendo a banca examinadora composta pela Dra. Paula Melo de Abreu Vieira (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Samantha Ribeiro Béla (Membro - UFOP) e pela Profa. Dra. Nivia Carolina Nogueira de Paiva (Co-Orientadora - Externo). 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 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Efeito do Polimorfismo Biológico e Molecular do Trypanosoma Cruzi Sobre o Processo Inflamatório e as Alterações da Matriz Extracelular no Coração e Cólon de Camundongos ao Longo da Fase Crônica da Infecção Experimental", na área de concentração: Imunobiologia de Protozoários. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau; segundo Profa. Dra. Samantha Ribeiro Béla; terceiro Profa. Dra. Nivia Carolina Nogueira de Paiva; quarto Dra. 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, 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, 10 de fevereiro de 2020.

Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Presidente

Profa. Dra. Nivia Carolina Nogueira de Paiva

Profa. Dra. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau

Profa. Dra. Samantha Ribeiro Béla

Mestranda

Laboratório de Morfopatologia
Departamento de Ciências Biológicas – UFOP

Ms. Thais Vieira de Carvalho

Ms. Viviane Flores Xavier

Laboratório de Immunopatologia
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Profª. Dra. Cláudia Martins Carneiro

Dr. Fernando Augusto Mathias Siqueira

Luciana da Fonseca Medeiros

Pauliana de Cássia Barbêdo

Prof. Washington Luiz Tafuri (*in memoriam*)

Laboratório de Biomateriais e Patologia Experimental
Departamento de Ciências Biológicas – UFOP

Prof. Dr. Laser Antônio Machado Oliveira

Laboratório de Immunoparasitologia
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - UFOP

Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso

Ms. Flávio Pignataro

**Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – Centro de Pesquisas
René Rachou/FIOCRUZ**

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e meu filho. Muito grata por todo apoio e amor recebido durante essa minha caminhada. Aos amigos que ganhei em Ouro Preto que são como família. E a todos os animais, com muito respeito, que contribuíram com a realização deste trabalho.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson Mandela

Agradeço a Deus, por ser meu guia em todos os momentos.

Aos meus pais José e Rita que são meu amor maior e com muito esforço permitiram que eu estudasse.

Aos meus irmãos Robert, Bruno, Dyonathan, Tallis, Tamires e Carol, mesmo longe sempre me deram apoio. Ao Snow que chegou em um momento muito difícil e com todo seu amor me fez a pessoa mais feliz.

À Prof.^a Dra. Paula Melo de Abreu Vieira por me orientar, obrigada por me aceitar e confiar em mim. Principalmente por toda paciência, levarei todos os ensinamentos para a minha vida. Eterna gratidão!

À Dra. Nívia Carolina Nogueira de Paiva por me coorientar nesse trabalho obrigada por todo apoio, pela dedicação, paciência, cumplicidade, por sempre se prontificar a me ajudar quando precisei e por tantos momentos compartilhados!

À Dra. Kátia da Silva Fonseca por toda paciência nos ensinamentos durante minha iniciação científica.

À Prof.^a Dra. Cláudia Martins Carneiro, por todos os conselhos dados durante minha passagem pelo LIMP. Muito obrigada!

À Viviane, minha companheira e amiga, com toda paciência do mundo sempre me ouviu nos momentos que mais precisei. E sua família que me acolheram com muito amor. Muito obrigada por tudo!

À Taynara, amiga, melhor *roommate*, que me ajudou muito em todos os momentos, me aconselhou e me deu forças para continuar minha caminhada. Agradeço com todo meu coração!

À Dani, Miris e Tami, por todo carinho e amizade. Levarei BM resistência para a vida. Gratidão!

À Aline pela amizade e companheirismo, à Flávia pelas contribuições sugeridas nesse trabalho e à Thais pela contribuição na técnica de confocal. Muito obrigada pelo auxílio constante e por todo apoio.

Aos alunos Pauliana, Samira, Leonardo, Lucas, Ivana, Aline Coelho em especial Amanda por ser uma grande amiga e a Jussara que é como uma filha. A todos meu muito obrigada!

Aos técnicos Rosália, Luciana e João por ajudarem tanto na realização desse trabalho. Agradeço imensamente!

Ao Dr. Fernando Augusto Mathias Siqueira, que com toda paciência, me ajudou na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso e Ms. Flávio Pignataro pela oportunidade e disponibilidade na realização da ELISA como contribuição final do desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Laser pela contribuição nas análises de microscopia confocal.

À Bia e Karla companheiras de curso e se não fossem por elas hoje não estaria onde estou. Eterna gratidão!

A todos do Laboratório de Imunopatologia, em especial Luísa, Lívia, Jamile, Rory, Dian, Ana Flávia, pela ótima convivência. Muito obrigada!

À Ana, minha amiga irmã, mesmo longe sempre me deu apoio. Muito obrigada!

À Ermi, Alice e Tamires, amigas de longas datas, que mesmo longe e quase sem se ver a nossa amizade continua sendo a mesma dos velhos tempos. Muito obrigada!

Ao Keirom meu amor, que chegou iluminando minha vida. Muito obrigada por tudo!

Aos professores da biologia, em especial Talvani pela oportunidade de monitoria, Fábio e Roberth pela inspiração em ser professora. Muito Obrigada!

À todos os demais colegas do Laboratório de Morfopatologia.

Aos Laboratórios Multiusuários de Microscopia e Citometria de fluxo do NUPEB/UFOP.

As professoras membros da banca, Juliana e Samantha pela disponibilidade e contribuições.

Aos animais de experimentação a minha gratidão e meu eterno respeito.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (CBIOL) pela inestimável formação profissional e pessoal.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Vários fatores atuam na patogênese da doença de Chagas (DCh), alguns são inerentes ao *Trypanosoma cruzi*, enquanto outros estão relacionados ao hospedeiro. Estudos demonstram uma associação entre o desenvolvimento de distintas formas clínicas e o tropismo tecidual de diferentes linhagens do *T. cruzi*, apontando o polimorfismo genético como fator crítico para o prognóstico da doença. Dados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que um isolado da cepa Berenice-78 (Be-78is) tem características histopatológicas semelhantes à cepa Be-62, bem como parasitemia semelhante à Be-78 parental, na fase aguda da DCh. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do polimorfismo biológico e molecular do *T. cruzi* sobre o processo inflamatório e as alterações da matriz extracelular no coração e cólon de camundongos ao longo da fase crônica da infecção experimental. Para isso 80 camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos experimentais: NI (não infectados), cepa Be-62, isolado Be-78is e cepa Be-78 parental, os animais foram eutanasiados aos 90 dias após a infecção (DAI). Os dados obtidos neste trabalho, mostram que os animais infectados pela cepa Be-78 parental mantiveram a carga parasitária no coração ao longo da infecção, se comparado aos dados da fase aguda (Nogueira-Paiva, 2015) no entanto, aos 90DAI, o processo inflamatório, exuberante na fase aguda foi capaz de gerar dano tecidual reparado com uma discreta fibrose, sugerindo na fase crônica recente, uma situação de equilíbrio entre parasito-hospedeiro, que pode estar relacionada à presença de amastigotas quiescentes, incapazes de gerar estímulo antigênico necessário à inflamação, portanto, “protegidas” do efeito citotóxico da resposta imune celular. Em contrapartida, os animais infectados pelo isolado Be-78is apresentavam um histotropismo preferencial para o cólon e uma resposta imune aparentemente controlada no coração, demonstraram, aos 90DAI, neste órgão, carga parasitária maior que a observada na fase aguda (Nogueira-Paiva, 2015) que embora, inferior em relação à cepa parental, acompanhada de processo inflamatório que foi importante no controle do parasitismo tecidual. Em detrimento do processo inflamatório sustentado na fase crônica, nenhuma alteração na expressão de laminina e conexina 43 foi observado nos animais infectados em relação os animais não infectados, o que pode estar relacionado ao aumento da citocina IL-10 encontrado nos animais infectados pelo isolado Be-78is que foi capaz de imunomodular o efeito citotóxico da resposta inflamatória. Assim, podemos concluir que no coração, o isolado Be-78is parece apresentar um perfil atrasado em relação à cepa Be-78 parental, podendo estar relacionado a uma patogenicidade inferior ou até mesmo por apresentar uma infecção mais silenciosa,

sendo necessárias análises mais tardias que poderiam evidencia melhor as lesões causadas nos casos clínicos na DCh.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Polimorfismo Biológico e Molecular; Matriz Extracelular

Several factors acting on the pathology of Chagas disease (DCh), some are inherent to *Trypanosoma cruzi*, while others are related to the host. Studies show an association between the development of different clinical forms and the geographical distribution of different *T. cruzi* strains, pointing to genetic polymorphism as a critical factor for disease prognosis. Data from our research group demonstrated that Be-78 has histopathological features similar to Be-62, as well as the parental parasitemia of Be-78 in the acute phase of DCh. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of *T. cruzi* biological and molecular polymorphism on the inflammatory process and extracellular matrix changes in the heart and colon of mice during the chronic phase of experimental infection. For this, 80 BALB/c mice were divided into three experimental groups: NI (uninfected), strain Be-62, parental Be-78is and Be-78 isolates, euthanized 90 days after infection (DAI). The data obtained in this work show that the animals infected with the parental Be-78 strain maintained the parasitic load on the heart throughout the infection, compared to the data from the acute phase (Nogueira-Paiva, 2015), however, at 90DAI, the process inflammatory, exuberant in the acute phase was able to generate tissue damage repaired with mild fibrosis, suggesting in the recent chronic phase, a situation of balance between host parasite, which may be related to the presence of quiescent amastigotes, unable to generate antigenic stimulus necessary for inflammation, therefore, “protected” from the cytotoxic effect of the cellular immune response. In contrast, the animals infected by the Be-78is isolate had a preferential histotropism for the colon and an apparently controlled immune response in the heart, demonstrated, at 90DAI, in this organ, a greater parasitic load than that observed in the acute phase (Nogueira-Paiva, 2015) which, although inferior to the parental strain, accompanied by an inflammatory process that was important in the control of tissue parasitism. To the detriment of the inflammatory process sustained in the chronic phase, no change in the expression of laminin and connexin43 was observed in infected animals compared to non-infected animals, which may be related to the increase in the cytokine IL-10 found in animals infected by the isolate Be -78is that was able to immunomodulate the cytotoxic effect of the inflammatory response. Thus, we can conclude that in the heart, the Be-78is isolate appears to show a delayed profile in relation to the parental Be-78 strain, which may be related to a lower pathogenicity or even to have a quieter infection, requiring later analyzes that could better evidence the injuries caused in clinical cases in DCh.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, **Biological and Molecular Polymorphism; Extracellular Matrix**

- APC:** Aloficocianina
- Be-62:** Cepa Berenice-62 do *Trypanosoma cruzi*
- Be-78:** Cepa Berenice-78 *Trypanosoma cruzi*
- Be-78is:** Isolado obtido por hemocultura
- BFA:** *Brefeldin A* (Brefeldina A)
- BSA:** *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)
- BZ:** Benznidazol
- CCA:** Centro de Ciências Animal
- CCC:** Cardiomiopatia chagásica crônica
- Cel:** Controle negativo sem anticorpo
- CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais
- DAI:** Dias após a infecção
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DCh:** Doença de Chagas
- DMSO:** *Dimethyl sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)
- DNA:** *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- DTU:** *Discret Typing Units*
- EDTA:** Ácido etilendiminotetracético sal dissódico
- ELISA:** *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*.
- FITC:** *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)
- FSC:** *Forward Scatter* (dispersão para frente)
- HBSS:** *Hank's Buffered Salt Solution* (Tampão de Hank)
- HE:** Hematoxilina-Eosina
- HEPES:** 2-[4- (2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanossulfônico
- IFN- γ** Interferon-gama
- IgG:** Imunoglobulina G
- IL-10:** Interleucina-10
- IL-1 β :** Interleucina-1-beta
- IL-6:** Interleucina-6
- iNOS:** *Inducible Nitric Oxide Synthase* (Enzima óxido nítrico sintase induzível)
- kDNA:** *Kinetoplastid DNA* (DNA do cinetoplasto)
- LSSP-PCR:** *Low-Stringency Single Specific Primer-Polymerase Chain Reaction*
- MEC:** Matriz extracelular
- NI:** Animais não-infectados

NK: *Natural Killer Cells* (Células *Natural Killer*)

NO: óxido nítrico

PBS: *Phosphate-Buffered Saline* (Tampão Salina-Fosfato)

PBS-P: *Phosphate-Buffered Saline-Permeabilization* (Tampão Salina-Fosfato de permeabilização)

PBS-W: *Phosphate-Buffered Saline-Wash* (Tampão Salina-Fosfato de lavagem)

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PE: Ficoeritrina

PerCp: Proteína Clorofila Peridinina

PS: *Picrosírius Red*

qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real ou quantitativa)

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SFB: Soro Fetal Bovino

SMF: Sistema Mononuclear Fagocitário

SNE: Sistema Nervoso Entérico

SRD: Sem Raça Definida

SSC: *Side Scatter* (Dispersão lateral)

Tc: DTU Tc

TGF- β : *transforming growth factor beta* (Fator de transformação do crescimento)

TGI: Trato Gastrointestinal

TLRS: *TOLL Like Receptor* (Receptor do tipo TOLL)

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral-alfa

TS: Tripomastigotas sanguíneas

- Figura 1:** Fluxograma representando as atividades propostas neste trabalho. 12
- Figura 2:** Fluxograma representando a distribuição dos animais infectados com diferentes subpopulações do *Trypanosoma cruzi* utilizados para determinar a taxa de mortalidade..... 12
- Figura 3:** Desenho esquemático representando as combinações de anticorpos marcados com fluorocromos utilizadas no ensaio de citometria de fluxo. 17
- Figura 4:** Representação da estratégia de análise da frequência de células inflamatórias com distintos fenótipos em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*. 19
- Figura 5:** Representação da estratégia de análise da frequência de macrófagos em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*. 20
- Figura 6:** Representação da estratégia de análise da frequência de linfócitos B em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*. 20
- Figura 7:** Representação da estratégia de análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, expressando IFN- γ em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is5-3mai, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*. 21
- Figura 8:** Avaliação da carga parasitária no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI) experimental com a cepa Be-78 parental (Be-78, ■) ou com o isolado Be-78is (Be-78is, ■). 27
- Figura 9:** Análise histopatológica do processo inflamatório no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). 28
- Figura 10:** Análise imunofenotípica do percentual médio de macrófagos (CD45⁺ F4/80⁺), linfócitos B (CD45⁺ CD19⁺), linfócitos T CD4⁺ (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺) e linfócitos T CD8⁺ (CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺) no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI).. 30
- Figura 11:** Análise dos níveis das citocinas IFN γ , IL-10 e TGF β no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). 31
- Figura 12:** Análise histopatológica do processo de neoformação de colágeno no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). 33
- Figura 13:** Avaliação morfométrica do componente da MEC, laminina, no coração de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). 35

Figura 14: Avaliação morfométrica do componente da MEC, laminina, no cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI).36

Figura 15: Avaliação morfométrica de conexina-43 no coração de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI).38

Figura 16: Representação esquemática dos resultados obtidos na ETAPA II da tese de doutorado Nívia Carolina Nogueira de Paiva, 2015..58

Figura 17: Representação esquemática dos resultados obtidos na ETAPA II da tese de doutorado Nívia Carolina Nogueira de Paiva, 2015.59

Tabela 1: Classificação atual das cepas do *Trypanosoma cruzi* em *Discrete Typing Units*.7

Tabela 2: Especificações dos anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo.17

Tabela 3: Especificações dos anticorpos utilizados nos ensaios por microscopia confocal. ...24

Tabela 4: Percentual de sobrevivência dos animais não infectados e infectados com as cepas de referência, Be-62 e Be-78 parental, e com o isolado Be-78is do *Trypanosoma cruzi*.26

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia e formas clinicas da doença de Chagas	1
1.2 Imunopatologia da doença de Chagas.....	3
1.3 Matriz extracelular e sua relação com a doença de Chagas	5
1.4 Polimorfismo biológico e molecular e as cepas Berenice's.....	6
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo Geral.....	10
3.2 Objetivos Específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Animais	11
4.2 Necropsia	13
4.3 Parasitismo tecidual	13
4.4 Resposta Imune	15
4.4.1 Intensidade do Processo inflamatório.....	15
4.4.2 Perfil fenotípico do processo inflamatório no coração e cólon	16
4.4.3 Citocinas	22
4.5 Componentes da MEC e Junções Comunicantes	22
4.5.1 Colágeno Tipo I e III	22
4.5.2 Laminina e Conexina-43	23
4.6 Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS	26
5.1 Sobrevida	26
5.2 Quantificação do parasitismo tecidual	26
5.3 Avaliação da reposta imune	27
5.3.1 Intensidade do processo inflamatório	27
5.3.2 Perfil fenotípico do processo inflamatório	28

5.3.3 Avaliação dos níveis de citocinas	30
5.4 Quantificação dos componentes da MEC e das junções comunicantes	32
5.4.1 Análise do processo de neoformação de colágeno	32
5.4.2 Avaliação morfométrica da laminina	34
5.4.3 Avaliação morfométrica da conexina-43 no coração	37
6. DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
7. CONCLUSÃO	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9. ANEXOS.....	57
9.1 Anexo 1: Certificado CEUA.....	57
9.2 Anexo 2: Representação dados da fase aguda	58
9.3 Anexo 3: Representação dados da fase aguda	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e formas clínicas da doença de Chagas

A doença de Chagas (DCh), conhecida também por Tripanossomíase Americana, recebeu esse nome em homenagem ao pesquisador brasileiro Carlos Chagas que descobriu a doença em 1909. Em seus estudos, Carlos Chagas conseguiu delinear o ciclo biológico da doença bem como a relação homem, ambiente silvestre e o agente etiológico causador de doença, o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Chagas, 1909). Inicialmente, a DCh era relacionada a um problema de saúde pública negligenciada apenas da América Latina, sendo endêmica em 21 países, porém, devido a migração de pacientes infectados para países da Europa e Ásia, hoje, a DCh está se expandindo mundialmente (WHO, 2019). Dados epidemiológicos mostram que existem cerca de 7 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* no mundo, 70 milhões vivendo sob o risco de contrair a DCh, 14 mil mortes por ano e que, somente cerca de 1% dos pacientes acometidos pela doença tem acesso ao tratamento antiparasitário (DNDi, 2019). O agente etiológico causador da DCh, o *T. cruzi*, é um protozoário hemoflagelado que pertence à ordem Kinetoplastida, família Tripanosomatidae e é capaz de infectar mamíferos como o homem e animais silvestres. Os hospedeiros invertebrados desse protozoário são insetos hematófagos e pertencentes à subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como “barbeiros”.

O ciclo se inicia quando o triatomíneo, durante o repasto sanguíneo, se alimenta de um mamífero infectado pelo *T. cruzi* no qual se encontram as formas tripomastigotas sanguíneas que ao chegarem ao estômago, em pH baixo, se transformam em epimastigotas e seguem para o intestino, onde irão se multiplicar por divisões binárias. Uma vez alcançando o reto, essas formas se transformam em tripomastigotas metacíclicas que são liberadas juntamente a urina e fezes, infectando outro hospedeiro, por meio de microlesões na pele ou mucosa adjacente, durante a hematofagia, reiniciando o ciclo no hospedeiro vertebrado (Machado *et al.*, 2012; Brener, 1969). As tripomastigotas metacíclicas invadem as células do hospedeiro, principalmente as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), retraem seu flagelo e se transformam na forma amastigota, que dentro da célula, iniciam sucessivas divisões binárias. Logo após inúmeros ciclos de replicação, as formas amastigotas dispõem novamente seu flagelo transformando-se nas formas tripomastigotas, que rompem a célula e são liberados na corrente sanguínea invadindo outras células e tecidos (Machado *et al.*, 2012; Cuevas *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 1998; Brener, 1978). A via de transmissão vetorial representa a via clássica,

sendo o *Triatoma infestans*, o *Triatoma dimidiata* e o *Rhodnius prolixus* os principais vetores do ciclo periurbano da DCh (Carod-Artal, 2013), sendo as espécies, *T. dimidiata* e *R. prolixus*, mais frequentes nas Américas do Sul e Central (Traverso, 2016) No Brasil, o vetor *T. infestans* é considerado controlado no domicílio e peridomicílio (Dias, 1997), porém tem sido relatada a presença deste vetor na Argentina e Bolívia (Traverso, 2016).

Apesar de todo o controle populacional sobre os vetores, existem outras vias de transmissão da DCh, sendo: via oral, transfusão sanguínea e transplantes de órgãos, acidentes laboratoriais e transmissão congênita (Guarner, 2019; Bustos *et. al.*, 2019; Filigheddu *et. al.*, 2017). Atualmente, houve diminuição dos casos ligados pela transmissão vetorial, no entanto, outras formas de transmissão tem ganhado importância, como por exemplo, a transmissão oral no Brasil e a transmissão sanguínea em regiões não endêmicas, como Europa e Ásia (Dias *et. al.*, 2008; Dopico *et.al.*, 2019). Em 2000, houve um surto em Santa Catarina pela ingestão de caldo de cana-de-açúcar contaminado e hoje, principalmente nas regiões Norte e Nordeste têm aumentando a cada dia o número de casos agudos confirmados de DCh relacionados ao consumo de açaí, podendo gerar um impacto negativo na economia desses estados (Steindel *et. al.*, 2008; Bastos *et. al.*, 2010; Nóbrega *et. al.*, 2009). Com a migração de pessoas infectadas para as áreas não endêmicas, tem-se o problema no controle de banco de sangue e transplantes de órgãos em relação à triagem incluindo teste anti-*T. cruzi*, o que vem tornando um grave problema de saúde pública mundial (Manne *et. al.*, 2013; Pane *et. al.*, 2018).

A DCh possui duas fases clinicamente distintas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda é caracterizada por altas taxas de parasitemia, seguidas por elevado parasitismo tecidual e conseqüentemente, intenso processo inflamatório, podendo ser encontrada presença de ninhos de amastigotas nos tecidos. Esta fase apresenta sintomas clínicos inespecíficos, como febre, dor abdominal, edema da face e hepatoesplenomegalia, podendo ser confundido com outras doenças. Diagnósticos falsos negativos contribuem para o agravamento da doença, tornando um problema de saúde pública (Andrade *et. al.*, 2014; Ortiz *et. al.*, 2018).

Apesar da persistência da infecção, cerca de 70% dos pacientes evoluem para forma crônica indeterminada da doença, apresentando sorologia positiva, porém exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen normais (Salvador, *et al.*, 2014; Rassi, A. & Marin-Neto, 2010). Entretanto, cerca de 30% dos pacientes apresentam alterações no tecido muscular cardíaco, caracterizando a cardiomiopatia chagásica e/ou alterações no trato digestório, representado pelos megas (megaesôfago e megacolon) (Rassi, A. & Marin-Neto, 2010). No Brasil o tratamento farmacológico disponível é o benznidazol (BZ), no entanto,

esse apresenta altos efeitos colaterais e baixa eficácia terapêutica na fase crônica da DCh (Alves Cunha *et. al.*, 2019).

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é umas das principais complicações da DCh, e está relacionada a distúrbios de condução de impulsos elétricos, arritmias, podendo evoluir para insuficiência cardíaca e até morte do indivíduo (Barry *et. al.*, 2019). Histologicamente, no coração, há presença de fibrose devido a intenso processo inflamatório causado pelo sistema imune, bem como alterações causadas pelo parasito, resultando em tecido conjuntivo denso e com perda do tônus muscular (Rassi, A. & Marin-Neto, 2010). Além disso, o *T. cruzi* induz uma série de danos celulares, como por exemplo, a diminuição das junções tipo *gap*, que são responsáveis pela passagem de Ca^{+} de uma célula para outra, resultando em falha de impulsos elétricos no coração causando arritmias e consequentemente a diminuição do débito cardíaco. (Carvalho *et. al.*, 1994). A persistência parasitária do *T. cruzi* no tecido muscular cardíaco está relacionada com a progressão e gravidade da doença, no qual a mortalidade chega a 4% e estima-se que mais de um milhão de pessoas no mundo sofram pela CCC (Rassi *et. al.*, 2006; Barry *et.al.*, 2019).

Na forma digestiva, que é representada pelo megaeosôfago e megacólon, a infecção pelo *T. cruzi* leva a destruição Sistema Nervoso Entérico (SNE), ocorrendo a perda do tônus muscular o que compromete a motilidade dos alimentos (Da Silveira *et al.*, 2007). Essa forma ocorre principalmente nas áreas endêmicas da DCh, como Argentina, Brasil, Bolívia e Chile em uma taxa de 15% dos pacientes acometidos pela doença (Bernardo *et. al.*, 2016; Prata, 2001; Rezende e Luquetti, 1994). As diferentes formas clínicas têm sido relacionadas principalmente a cepas policlonais, no qual o *T. cruzi* tem a capacidade de invadir diferentes tecidos e induzir respostas distintas frente ao hospedeiro. Assim, é importante compreender a relação parasito-hospedeiro e sua associação com as diferentes formas clínicas existentes, e com isso elaborar fármacos ou vacinas capazes de eliminar qualquer tipo de cepa e formas existente de *T. cruzi*.

1.2 Imunopatologia da doença de Chagas

No hospedeiro, durante uma infecção por *T. cruzi*, a resposta imune é ativada dando início a fase aguda, que é caracterizada principalmente pela alta parasitemia sanguínea e alto parasitismo tecidual, podendo se estender até a fase crônica, causando a diminuição dos níveis de parasitemia. Esse controle se dá devido à montagem de diversos mecanismos da resposta

imune inata e principalmente da adaptativa. Quando há uma infecção pelo *T. cruzi*, a resposta imune assume um papel muito importante no controle da invasão celular.

Em relação à resposta imune inata, células *natural killer* (NK), células dendríticas, macrófagos e principalmente citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, realizam papel fundamental no controle da infecção, acarretando em uma resposta rápida e intensa (Huang *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2012). A interação das células da imunidade inata com as células da imunidade adquirida é mediada por receptores do tipo Toll (TLRS), que fazem essa resposta ser mais eficiente, estimulando a síntese principalmente de citocinas como IL-12 e TNF (Machado *et al.*, 2012; Coelho *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2009). A estimulação de IL-12 é mediada pela produção de IFN- γ por meio da ativação de NK e células tipo Th1, que consequentemente ativam macrófagos a produzir óxido nítrico (NO) e *óxido nítrico sintase induzível* (iNOS) (Kayama H, Takeda K, 2010; Yarovinsky *et al.*, 2005). Na imunidade humoral, os linfócitos B assumem papel importante no controle da infecção, bem como a resposta celular. Já os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ desencadeiam a resposta via Th1 favorecendo assim o controle da infecção pelo *T. cruzi* (Sullivan *et al.*, 2015; Cardillo *et al.*, 2007).

Na infecção pelo *T. cruzi* ocorre, então, uma ativação intensa do sistema imune o que leva ao controle do parasitismo, porém o parasito não é totalmente eliminado. Com isso, essa resposta imune se prolonga causando lesões teciduais, levando as formas clínicas da doença de Chagas, como quadro de CCC e acometimento do trato gastrointestinal (TGI) (Lana, M. e Tafuri, W.L., 2005).

A CCC é a forma clínica mais frequente, possui intenso processo inflamatório no miocárdio, o que leva ao dano tecidual e uma correlação da doença com a miocardite (de Oliveira *et al.*, 2016; Cunha-Neto E. & Chevillard C., 2014). De acordo com Cunha-Neto *et al.*, 2009, esse dano tecidual está relacionado ao direcionamento da resposta imune do tipo Th1, produzidas ao longo da fase crônica da infecção, causando destruição muscular cardíaca e consequentemente a fibrose do tecido. Além disso, citocinas como IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-10 e TGF- β , induzem ou regulam a produção de quimiocinas por macrófagos infectados e miocardiomiócitos (Machado *et al.*, 2012a), que podem influenciar diretamente no controle de infecção celular. Assim, embora a resposta imune seja importante fator no combate à infecção pelo *T. cruzi*, na ausência de imunomodulação, induz lesões graves no tecido cardíaco.

Já nos megas (cólon e/ou esôfago), as lesões teciduais estão relacionadas à musculatura lisa e ao Sistema Nervoso Autônomo Periférico (SNAP), associados ao intenso

processo inflamatório e à fibrose. Ocorre redução do número de neurônios, o que causa perda do tônus muscular, alargamento do TGI e conseqüentemente perda da motilidade dos alimentos, resultando em constipação (Dutra *et al.*, 2009; Da Silveira *et al.*, 2007). A inflamação nos órgãos do TGI às vezes é focal, acarretando em miosite mais intensa no esôfago do que no cólon, relacionada à presença de infiltrados de mastócitos e de eosinófilos (Tafari, 1974; Pinheiro *et al.*, 2003; Da Silveira *et al.*, 2007). Esse infiltrado inflamatório estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF, acarretando destruição tecidual e conseqüentemente a fibrose (Da Silveira *et al.*, 2007).

1.3 Matriz extracelular e sua relação com a doença de Chagas

A matriz extracelular (MEC) é uma rede de proteínas e polissacarídeos que organizam a estrutura tecidual, dando elasticidade, suporte, força por meio de fibras e microfibrilas que se unem formando uma rede entre as células garantindo adesão e comunicação. Na doença de Chagas, o *T. cruzi* remodela os componentes da MEC durante a interação parasito-hospedeiro para invadir a célula. Esse remodelamento induz a degradação enzimáticas dos componentes da MEC, como por exemplo, laminina e fibronectina, que são alvos de estudos atuais na DCh. (Fares *et al.*, 2013). Estudo envolvendo um grupo de famílias de proteínas presentes na superfície das formas tripomastigotas sanguíneas (TS), vem sendo estudado para compreender a ligação dessas proteínas de superfícies com os componentes da MEC (Teixeira, et al., 2015). Devido à degradação dos componentes da MEC pelo parasito, o sistema imune induz diversos mecanismos de reparo, como a liberação de TGF- β , que desempenha papel importante no desenvolvimento de fibroses e hipertrofias, já que atua diretamente na deposição de colágeno e regulação dos componentes da MEC (Ferrão, 2014).

A laminina é uma glicoproteína, de cadeia α , β e γ e é o principal componente da formação da lâmina basal (Chung *et al.*, 1979). Já foi demonstrado que o *T. cruzi* consegue se ligar a componentes de laminina degradada e assim invadir a célula hospedeira (Mattos *et al.*, 2012). Giordano *et al.*, (1994) realizaram um estudo no qual utilizaram anticorpos anti-laminina e esses foram capazes de impedir a invasão de tripomastigotas nas células hospedeiras, o que sugere que a laminina está diretamente ligada a adesão celular parasito-hospedeiro. Além disso, na fase crônica a citocina TGF- β promove a migração de componentes da MEC, como laminina, fibronectina e proliferação de fibroblastos, que são responsáveis pelo remodelamento tecidual em processos de fibrose, em decorrência as lesões causadas nos tecidos pelo sistema imune (Lijnen *et al.*, 2000). Assim, a fibrose é um fator

muito importante quando se relaciona a fase crônica da doença de Chagas. É caracterizada por deposição de tecido conjuntivo, como exemplo os colágenos tipo I e III, que estão presentes no processo de cicatrização. A fibrose é uma condição importante para o desenvolvimento de disfunção do coração, causando a CCC e a perda da função motora tanto no esôfago e cólon nos megas (Noya-Rabelo et al., 2018; Matsuda et al., 1995)

Apesar de não fazer parte da MEC, as conexinas são os principais componentes das junções de *gap*, responsáveis pela passagem de compostos iônicos de uma célula para outra. Essas junções coordenam as atividades fisiológicas entre as células e sua deficiência pode implicar na formação de processos patológicos (Cronier et al., 2001). Na doença de Chagas, tem sido estudado o comprometimento da conexina-43, pois essa proteína é bastante expressa nas células musculares do coração (Kumar e Gilula, 1996). A infecção pelo *T. cruzi* nos cardiomiócitos, desencadeia diversos fatores imunológicos que acarretam a destruição das células infectadas. Essa destruição interfere diretamente na comunicação das células, o que pode causar a ocorrência de arritmias, insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio (Severs et al., 2004; Kostin et al., 2003). Esse distúrbio causado pela infecção do *T. cruzi* no coração pode ser associado à resposta imune efetora por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias que podem contribuir para o acometimento do coração, causando a CCC, associada à perda dessas conexinas, levando ao mal funcionamento das funções cardíacas como insuficiência e arritmias (Berreto, 2019; Adesse et al., 2011).

1.4 Polimorfismo biológico e molecular e as cepas Berenice's

Em 1994, durante várias reuniões a cerca da doença de Chagas, foi lançado “O projeto genoma de *T. cruzi*” pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que tem como objetivo aplicar as novas tecnologias e conhecimentos sobre a biologia do parasito e assim criar novas estratégias terapêuticas para a doença de Chagas (Pedroso, 2004). Há muitos anos, tem sido estudadas características policlonais das cepas de *T. cruzi* (Romanha et al., 1979; Miles et al., 1977), e atualmente, tem sido avaliado o papel do polimorfismo biológico e genético de populações de *T. cruzi* no direcionamento das diferentes formas clínicas da doença de Chagas (Nogueira-Paiva, 2015; Miles et al., 2009).

Em 1999 foi realizada uma Reunião Satélite na Fiocruz, no qual especialistas discutiram sobre a convergência em agrupar as cepas de *T. cruzi* em apenas dois grandes grupos, de acordo com suas características biológicas, bioquímicas e moleculares, denominados em *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Zingales, et al., 2009; Miles et al., 1981). Ao longo

dos estudos, foram feitas várias associações e várias classificações (biodemas, zimodemas, esquizodemas, rapdemas), até chegar ao consenso em 2009 na segunda Reunião Satélite, no qual as cepas de *T. cruzi* foram divididas em seis *Discrete Typing Units* (DTU): I, II, III, IV, V e VI, em um conjunto de características biológicas, moleculares e genéticas, como mostra a Tabela 1 (Zingales, *et al.*, 2009; Sturm e Campbell, 2010; Anon, 1999). Posteriormente Zingales *et al.*, (2012) apresentaram uma correlação dessas DTUs em relação a taxonomia, estrutura populacional e características epidemiológicas e filogeográficas de populações de *T. cruzi*, como mostra na tabela 2.

Tabela 1: Classificação atual das cepas do *Trypanosoma cruzi* em *Discrete Typing Units*.

Designação DTU	Abreviatura	Equivalência
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I ^{a,b} e DTU I ^c
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II ^a e DTU IIb ^c
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT ^d , Z3-A ^e , DTU IIc ^c e <i>T. cruzi</i> III ^f
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 ^d , Z3-B ^e , DTU IIa ^c
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Boliviano Z2 ^d , rDNA 1/2 ^g , clonet 39 ^h , DTU II ^d
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Paraguaio Z2 ⁱ , zimodema B ^j e DTU IIe ^c

DTU: *Discrete Typing Units*; a: Anonymous 1999; b: Falla *et al.* 2000; d: Miles *et al.* 1981; e: Mendonça *et al.* 2002; f: Freitas *et al.* 2006; g: Souto *et al.* 1996, Tibayrenc & Ayala 1991; i: Chapman *et al.* 1984; j: Romanha & Brener, 1988, Carneiro *et al.* 1990.

Fonte: Adaptado de Zingales *et al.*, 2009.

As cepas policlonais possuem populações ou clones com características geneticamente distintas, em função desse polimorfismo, a relação parasito-hospedeiro pode variar de acordo com os isolados presentes (Messenger e Miles, 2015; Miles *et al.*, 2009). Dentro desta condição policlonal, baseada na literatura e nos estudos do grupo de pesquisa, diferentes subpopulações podem induzir mecanismos patogênicos distintos com consequências sobre o desenvolvimento das diferentes formas clínicas. (Nogueira-Paiva, 2015). Evolutivamente essa característica se tornou importante para a patogenicidade do parasito em relação ao hospedeiro, o que aumenta a sua diversidade, relacionado principalmente à evasão da resposta imune (Berry *et al.*, 2019).

A cepa Berenice foi isolada da primeira paciente de Carlos Chagas, Berenice Soares de Moura, que vivia em Lassance/MG, área endêmica para DCh (Chagas, 1909). Dessa

mesma paciente foram isoladas em anos distintos, amostras que foram denominadas Berenice-62(Be-62) e Berenice-78 (Be-78), que mesmo sendo da mesma paciente compartilham características biológicas diferentes (Lana, 1981; Lana e Chiari, 1986; Nogueira-Paiva et al., 2015; Salgado et al., 1962). De acordo com a classificação atual, as duas cepas pertencem ao DTU TcII, no entanto, alguns estudos mostraram que cepas com o mesmo DTU, como as cepa Be-78 e Y (DTU TcII) apresentaram histotropismo diferente assim como características patogênicas distintas no modelo cão (Nogueira-Paiva et al., 2014, Lana, 1981).

A cepa Be-62 apresenta maior virulência e patogenicidade se comparada a Be-78, de acordo com dados do nosso grupo de pesquisa, no qual a Be-62 tem pico de parasitemia em torno do sétimo dia de infecção e apresenta taxa de 100% de mortalidade ainda na fase aguda recente. Já a Be-78 apresenta pico de parasitemia em torno do décimo quinto dia e tem uma taxa de 100% de sobrevida, capaz de crônificar (Nogueira-Paiva, 2015; Lana, 1981). Isso provavelmente ocorre devido à cepa Be-62 apresentar formas mais delgadas e assim conseguir invadir a célula e replicar mais rápido do que a cepa Be-78 que apresenta predomínio de formas mais largas (Lana e Chiari, 1986; Lana, 1981; Guedes *et al.*, 2007). Estudos feitos por Nogueira-Paiva, 2015 na fase aguda da infecção mostrou que o isolado da cepa Be-78 parental apresenta bandas comuns tanto à cepa Be-78 parental quanto à cepa Be-62, sendo o isolado Be-78is com parasitemia e sobrevida semelhantes à cepa Be-78 parental, porém patogenicidade e histotropismo semelhante a cepa Be-62 (Nogueira-Paiva, 2015). Assim, o isolado compartilha semelhanças gênicas tanto pela cepa Be-78 parental e também pela cepa Be-62, mostrando que existe um perfil intermediário entre ambas as cepas.

Entender os aspectos biológicos e moleculares da cepa e seu isolado em relação a resposta da infecção é muito importante para elucidar seu comportamento perante o hospedeiro e como essas diferenças atuam na patogenicidade. Além de estudos genéticos para investigação da heterogeneidade intraespecífica do parasito, a associação destes com a avaliação do processo histopatogênico poderia esclarecer a importância das diferentes subpopulações na determinação das manifestações clínico-epidemiológicas da doença. Bem como compreender os mecanismos moleculares do *T. cruzi* com a infecção célula hospedeira e assim criar novas estratégias terapêuticas para evitar sua replicação no hospedeiro.

2. JUSTIFICATIVA

Achados histopatológicos mostram que na cardiomiopatia chagásica a alteração motora é resultado principalmente da destruição tecidual como consequência do processo inflamatório ativo e sustentado que leva à fibrose. Em contrapartida, estudos indicam que nas lesões do trato digestório, as consequências mais relevantes da resposta inflamatória persistente estão relacionadas às alterações do Sistema Nervoso Entérico. Portanto, a patogênese das lesões cardíacas e digestivas parece ocorrer por mecanismos de interação parasito-hospedeiro distintos. Assim sendo, a caracterização destas lesões e a participação do parasito, no contexto da resposta inflamatória e da matriz extracelular no curso da infecção pelo *T. cruzi* poderá contribuir não só para elucidação dos fenômenos relacionados aos danos teciduais, além de esclarecer a evolução e processo de reparo nestes órgãos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do polimorfismo biológico e molecular *do Trypanosoma cruzi* sobre o processo inflamatório e as alterações da matriz extracelular no coração e cólon de camundongos ao longo da infecção experimental crônica.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Quantificar a carga parasitária;
- ✓ Quantificar o processo inflamatório;
- ✓ Avaliar os fenótipos celulares presentes no coração e cólon;
- ✓ Quantificar as citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β ;
- ✓ Avaliar os componentes da MEC: colágeno e laminina
- ✓ Avaliar expressão de conexina-43 no coração;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Oitenta camundongos da linhagem BALB/c, com 30 dias de idade, foram distribuídos em quatro grupos experimentais: não-infectado (NI, n=4+16); infectado com a cepa Be-62 (Be-62, n=4+16); infectado com um isolado da cepa Be-78 (Be-78is, n=4+16); infectado com a cepa Be-78 parental (Be-78, n=4+16) (Figura 1). O n=4 representa o total de animais utilizados por grupo nas análises histopatológicas, carga parasitária e citocinas, já o n=16 representa o *pool* no total de animais utilizados por grupo para análise de imunofenotipagem. Os animais foram inoculados, por via intraperitoneal, com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS) obtidas após descongelamento das amostras e duas passagens sucessivas em camundongos *Swiss*. A infecção foi confirmada por observação de TS em exame de sangue a fresco. Os animais foram mantidos no Centro de Ciência Animal-CCA/UFOP com ração e água *ad libitum*. A subpopulação Be-78is foi obtida a partir de hemocultura de camundongos *Swiss* após 3 meses de infecção com a cepa Be-78 parental. Os isolados foram caracterizados utilizando parâmetros biológicos (curva de crescimento em meio axênico, taxa de infectividade e desenvolvimento intracelular *in vitro*) e gênico (*Low-Stringency Single-Specific-Primer-LSSP-PCR*). O isolado selecionado apresentou perfil biológico e gênico intermediário entre as cepas Be-78 parental e Be-62 (Nogueira-Paiva et al., 2015).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), tendo sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Protocolo nº 2014/29).

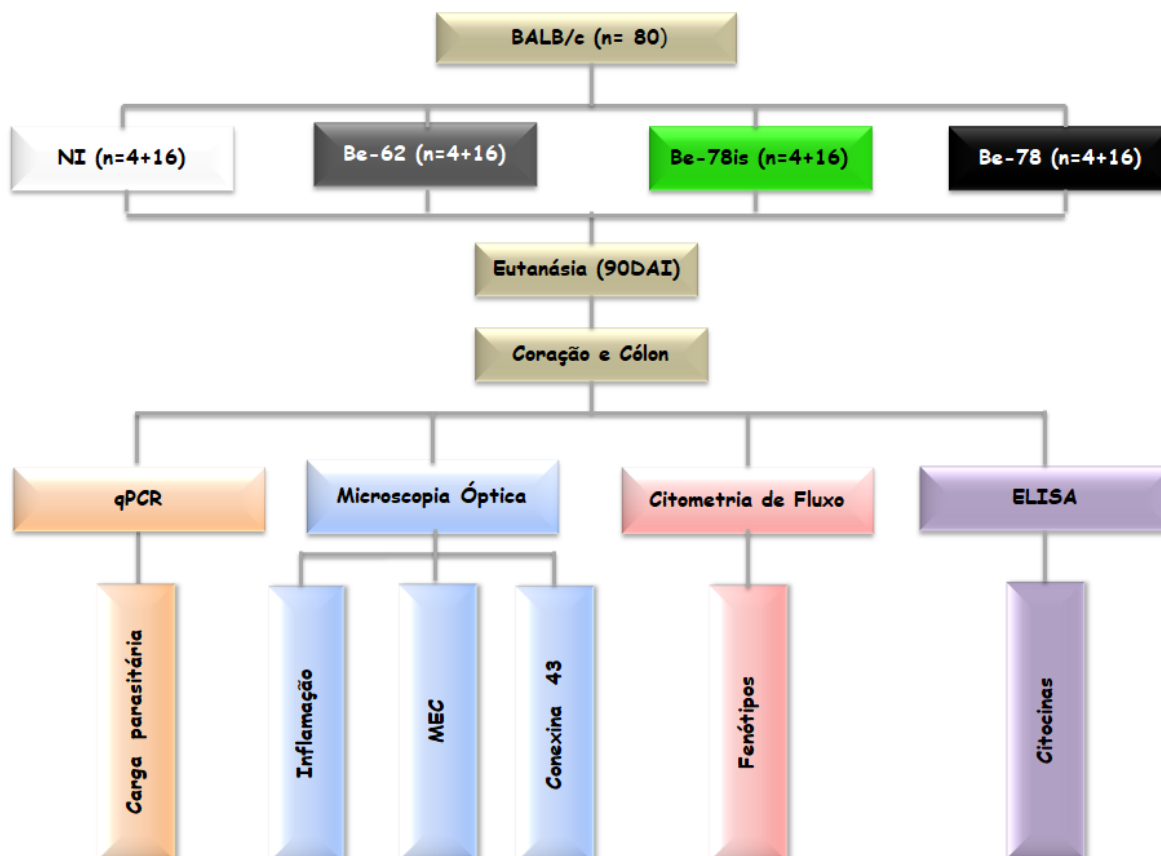


Figura 1: Fluxograma representando as atividades propostas neste trabalho. NI: não-infectado; Be-62: infectado com a cepa Be-62; Be-78is: infectado com o isolado da cepa Be-78; Be-78: infectado com a cepa Be-78 parental do *T. cruzi*; DAI: Dias após a infecção; MEC: matriz extracelular; qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction*; ELISA: *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*.

Sobrevida

A taxa de sobrevida foi avaliada nos animais, diariamente até 90 dias após a infecção sendo a mortalidade registrada e expressa em porcentagem cumulativa.

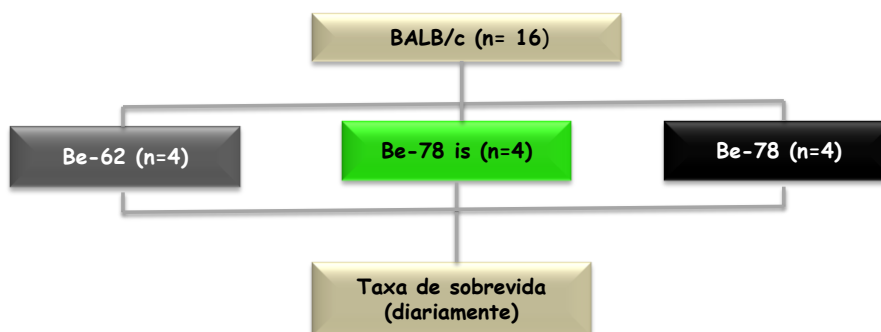


Figura 2: Fluxograma representando a distribuição dos animais infectados com diferentes subpopulações do *Trypanosoma cruzi* utilizados para determinar a taxa de mortalidade. Be-62 (■): grupo de animais infectados com a cepa Be-62; Be-78 isolado (■): grupo de animais infectados com o isolado Be-78is obtido a partir da cepa Be-78 parental; Be-78 parental (■): animais infectados com a cepa parental Be-78.

4.2 Necropsia

Quatro animais de cada grupo foram eutanasiados, por deslocamento cervical, aos 90 dias após a infecção (DAI), sendo procedida a necropsia, onde o coração *in totum* e o cólon (região reto-sigmóide) foram coletados, sendo um fragmento de cada órgão fixado em solução Metanol 80%/Dimetilsulfóxido (DMSO) 20% (Dimetilsulfóxido) para posterior avaliação, por microscopia confocal, dos componentes da matriz extracelular e da conexina-43, enquanto um segundo fragmento foi submerso em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer -80°C para quantificação do parasitismo tecidual (*quantitative-PCR*). As amostras fixadas em Metanol-DMSO foram mantidas em freezer-20°C durante sete dias, sendo conduzida a troca da solução nos três primeiros dias após a coleta.

4.3 Parasitismo tecidual

Para a extração do DNA a partir de amostras de coração e cólon foi utilizado o kit Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Fragmentos de coração e cólon foram armazenados inicialmente à -80°C, cortados e pesados, obtendo-se fragmentos de 15-25 mg. Nos tubos contendo os fragmentos de tecido foram adicionados, inicialmente, 500µL de solução de lise nuclear e em seguida colocou-se os mesmos tubos no gelo por dois minutos. Posteriormente, estes foram homogeneizados por inversão, adicionados de 20 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) a 20mg/mL e mantidos overnight em banho seco à 55°C. Após este período, eles foram adicionados de três µL de RNase e colocados por 30 minutos em banho seco à 37°C. Em seguida, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por cinco minutos e adicionados de 200µL de solução de precipitação proteica. As amostras foram homogeneizadas por 20 segundos utilizando-se o aparelho vortex (Certomat MV, B. Braun Biotech International, USA), e centrifugadas por cinco minutos à 16.000g (Microcentrifuga Eppendorf®- Modelo 5418, NY, USA). Foi realizada a transferência dos sobrenadantes para outros tubos nos quais haviam sido adicionados previamente 600µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha). Estes tubos contendo as amostras foram então homogeneizados e centrifugados por 1,5 minutos a 16.000g. Os sobrenadantes foram então descartados e os sedimentos foram adicionados de 200µL de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha). Após ser realizada outra centrifugação a 16.000g, os sobrenadantes foram descartados novamente e os tubos deixados abertos

objetivando que o etanol 70% remanescente evaporasse. Foi acrescentado então 100µL de solução de hidratação a cada tubo e o DNA foi mantido por 24 horas à temperatura ambiente para reidratação. Logo após, dois µL da solução contendo o DNA extraído foram utilizados para determinar a concentração e avaliar o grau de pureza do mesmo por meio das razões nas absorvâncias de 230/280nm e 260/280nm em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA). Em seguida, as amostras foram armazenadas à -20°C até o momento da determinação da carga parasitária por qPCR.

Foi preparada uma curva padrão para que fosse possível determinar o número de cópias do DNA do parasito. Neste sentido, utilizou-se epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) cultivadas em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose), até atingir o número de 1×10^8 parasitos. A quantidade de parasitos foi determinada realizando-se a contagem em câmara de Neubauer e após a extração de DNA da massa de epimastigotas, foi construída a curva padrão. Após eluição do pellet de DNA extraído em 100mL de água ultra pura autoclavada, a concentração final foi de 10^6 parasitos/mL, considerando a extração aproximadamente 100% eficiente. A concentração e a pureza do DNA extraído foram determinadas em nanoespectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, EUA) nos comprimentos de onda de 260/280 e 260/230nm, e posteriormente foram realizadas diluições seriadas de 10x, com obtenção de sete pontos, de 10^6 a 1 parasito, utilizados na curva. A curva padrão foi utilizada como referência e acrescentada à todas as placas em triplicata. As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - MicroAmp®Optical 96 - Well Reaction Plate (Applied Biosystems by Life Technologies, USA), seladas com adesivos ópticos- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems by Life Technologies, USA) em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA). Foram utilizados apenas os resultados das reações nas quais a curva padrão teve eficiência entre 85 – 110% e obteve valores satisfatórios de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,95-0,999$). As amostras da curva padrão foram consideradas controles positivos e os poços nos quais foi adicionada água livre de nucleases (sem adição de DNA) foram considerados os controles negativos bem como as amostras do grupo NI que foram submetidas à reação com os iniciadores específicos do *T. cruzi* para controle de reação inespecífica. Os iniciadores para o DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; os quais amplificam um fragmento de 182pb do parasito (Cumming e Tarleton, 2003). As reações foram realizadas em duplicata, sendo utilizados 60ng/µL de DNA genômico, cinco µL de Go Taq® qPCR Master Mix (Promega),

dois μL dos iniciadores e água livre de nucleases em quantidade suficiente para totalizar o volume final de $10\mu\text{L}$ por poço. Simultaneamente, na mesma placa, foi realizada a amplificação do gene do fator alfa de necrose tumoral murino - específico (TNF- α). Este foi utilizado para verificar a integridade do DNA analisado, uma vez que é expresso de forma constitutiva no modelo animal avaliado. Para a amplificação do gene TNF, foram utilizados os pares de iniciadores: TNF- 5241 5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3' e TNF- 5411 5' CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3' (Cummings e Tarleton, 2003), os quais amplificam um fragmento de 170 pares de bases. Durante as reações, as amostras inicialmente foram submetidas à processo de desnaturação à 95°C por 10 minutos, e em seguida por 40 ciclos à 95°C por 15 segundos e 63°C por 1 minuto. A quantidade de cópias de DNA em cada amostra foi determinada a partir de uma regressão linear utilizando os valores do Ct das amostras da curva padrão, sendo consideradas negativas as amostras com Ct acima do último ponto da curva. Os resultados foram expressos pelo número de parasitos/mg de tecido.

4.4 Resposta Imune

4.4.1 Intensidade do Processo inflamatório

a) Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

A coloração por HE foi realizada em cortes histológicos do coração e cólon para análise qualitativa e quantitativa do infiltrado inflamatório. Os cortes com $4\mu\text{m}$ 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. Em seguida, foram lavados em água corrente e levados à estufa a 56°C para secagem. Após completa secagem dos cortes, as lâminas foram montadas com o auxílio de Entellan e lamínula.

b) 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 20 imagens para coração (área total percorrida igual a $7,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$) e 30 imagens aleatórias para cólon (área total percorrida igual a $1,06 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40x foram

digitalizadas através do microscópio óptico digital Leica DM5000B, microcâmera MC170HD, com auxílio do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.0 R1) ambos pertencentes ao Laboratório Multiusuários de Microscopia Avançada e Microanálise (LMU-MAM) 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.

4.4.2 Perfil fenotípico do processo inflamatório no coração e cólon

a) Imunofenotipagem de suspensões celulares de coração e cólon

As suspensões de células do coração e cólon foram obtidas em *pool* (4 animais em cada *pool*) e preparadas de acordo com as metodologias adaptadas descritas por Cuervo et al., (2011) e Figueirero et al., (2011). Em ambiente estéril, após a eutanásia e coleta dos órgãos em meio completo RPMI (5% Soro Fetal Bovino-SFB), as amostras foram cortadas em fragmentos de 1mm, lavadas em tampão *Hank's Buffered Salt Solution*-HBSS + 5% de SFB + 25mM de HEPES e incubadas em dois banhos de 30 minutos em solução de pré-digestão em *Dithiothreitol*-DTT a 1 mM à 37° C sob agitação (120 rpm). Após lavagem em tampão HBSS + 5% de SFB + 25mM de HEPES foi procedida a digestão em duas incubações de 60 minutos cada em solução de colagenase a 0,01% (*Collagenase type II from Clostridium histolyticum*) sob agitação (120rpm) e à 37°C. As suspensões celulares foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, ressuspendidas em 10mL de solução HBSS + 5% de SFB + 25mM de HEPES e filtradas em um primeiro sistema de filtros com malha de 100µm. Após centrifugação sob as mesmas condições anteriores, as suspensões celulares foram ressuspendidas em 10 mL de solução HBSS + 25 mM de HEPES + 2mM EDTA e novamente filtradas em um segundo sistema utilizando malha de 40µm para retirada dos *debris* celulares. Após nova centrifugação, as suspensões celulares ressuspendidas em meio completo RPMI (5% de SFB) foram submetidas à quantificação em câmara de Neubauer. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 3 mL de tampão de lavagem – PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina – BSA e 0,1% de azida sódica), por centrifugação a 1200 rpm durante 7 minutos a 18°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspendidas em 2 mL de PBS-W. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos anti-moléculas de superfície (CD45, CD3, CD4, CD8,

CD19 e F4/80 – Figura 6 e Quadro 3) por 30 minutos ao abrigo da luz. As especificações dos anticorpos, fluorocromos, assim como a titulação padronizada são mostrados na Tabela 2. Após a etapa da identificação das populações celulares, procedeu-se à lise dos eritrócitos e à fixação dos leucócitos pelo tratamento com 2mL de solução de lise por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas com 100 µl de PBS-P e, em seguida, com 200 µl de PBS-W. As preparações celulares foram então fixadas em 200 µl de solução fixadora e estocadas a 4°C ao abrigo da luz até a sua leitura no citômetro de fluxo.

Tabela 2: Especificações dos anticorpos utilizados no ensaio de citometria de fluxo.

Anticorpos (Marca)	Fluorocromo	Especificações/Isotipo Clone	Titulação	Fenótipo alvo
CD45 (eBioscience)	APC	Rat anti-mouse/IgG2b Clone: 30F11	1:10	Pan-leucocitário
F4/80 (eBioscience)	FITC	Rat anti-mouse/IgG2a Clone: BM8	1:10	Macrófagos
CD19 (eBioscience)	FITC	Rat anti-mouse/IgG2a Clone: eBIO1D3	1:10	Linfócitos B
CD3 (Biolegend)	FITC	Rat anti-mouse/IgG2b Clone: 17A2	1:10	Linfócitos T
CD4 (Biolegend)	PerCp	Rat anti-mouse/IgG2a Clone: RM4-5	1:10	Células CD4 ⁺
CD8 (Biolegend)	PerCp	Rat anti-mouse/IgG2b Clone: 53-6.7	1:10	Células CD8 ⁺

CD: *cluster of differentiation*; APC: Alociocianina; FITC: Isotiocianato de Fluoresceína; PercP: Proteína Clorofila Peridina; PE: Ficoeritrina.

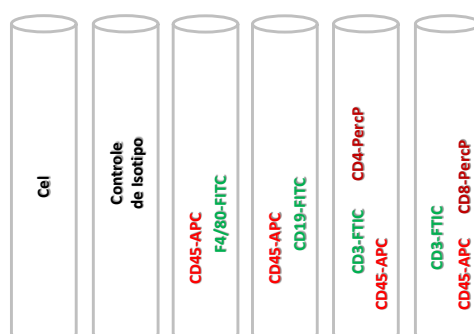


Figura 3: Desenho esquemático representando as combinações de anticorpos marcados com fluorocromos utilizadas no ensaio de citometria de fluxo. As cores representam os espectros de emissão dos fluorocromos.

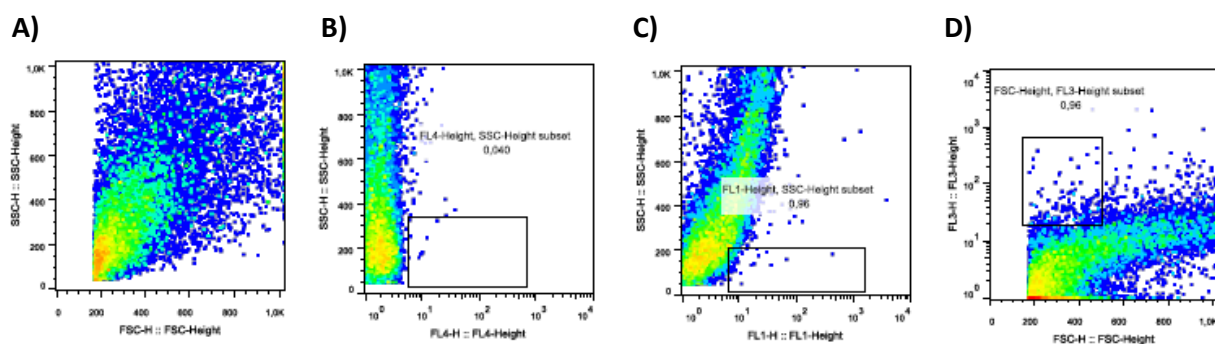
b) Estratégia de análise do perfil fenotípico do processo inflamatório no coração e cólon

A aquisição de eventos foi realizada no citômetro de fluxo FACScalibur - Becton Dickinson, utilizando o programa CELLQuest™Pro. As células das suspensões celulares de coração (20.000 eventos) e cólon (100.000 eventos) foram adquiridas em escala linear e inicialmente identificadas pelos parâmetros tamanho da célula (dispersão para frente [FSC]) e complexidade interna (dispersão lateral [SSC]). A seleção das populações de células leucocitárias foi baseada na utilização de marcadores de linhagem e análise multiparamétrica com combinações de regiões em gráficos bidimensionais de distribuição pontual (*Pseudocolor "Large Dot"*).

A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análise de dados de citometria de fluxo FlowJo™ v10.6.2. Os resultados foram expressos como frequência (%) das populações de macrófagos, de linfócitos B e das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em relação às células com fenótipo CD45⁺.

A Figura 4 representa a distribuição da população, em gráficos bidimensionais de distribuição pontual com as diferentes combinações, nas suspensões celulares de coração e cólon em tubo controle "Cel" (onde não foram adicionados anticorpos). Os controles negativos foram utilizados para determinar a localização do *gates* utilizados para identificar as populações positivas para cada fenótipo, sendo os limites aplicados como *cut-off*, as regiões que abrangiam população negativa inferior a 1%.

CORAÇÃO



CÓLON

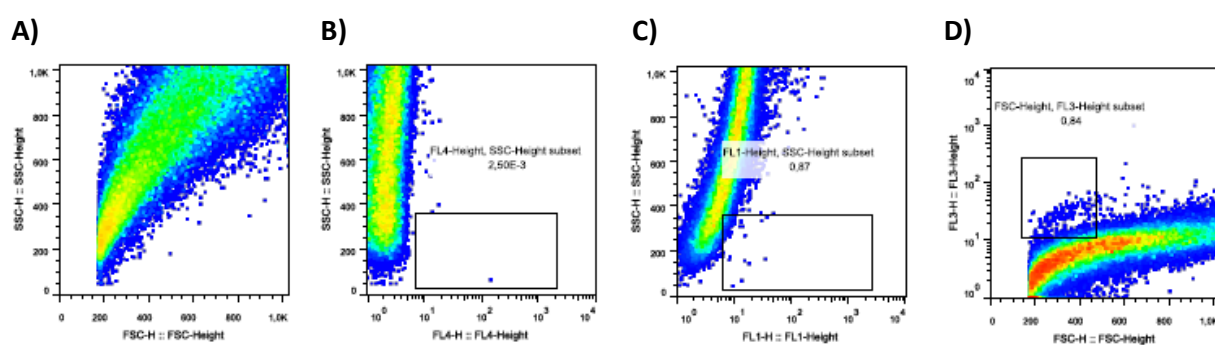


Figura 4: Representação da estratégia de análise da frequência de células inflamatórias com distintos fenótipos em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*: (A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho (FSC) versus Granulosidade (SSC) demonstrando o padrão de distribuição da população nas suspensões celulares de coração e cólon (B) Gráfico de distribuição pontual FL4 versus Granulosidade (SSC) no tubo controle demonstrando ausência de fluorescência; (C) Gráfico de distribuição pontual FL1 (CD3 FITC) versus SSC no tubo controle demonstrando ausência de fluorescência; (D) Gráfico de distribuição pontual FSC versus FL3 no tubo controle demonstrando ausência de fluorescência.

A subpopulação de leucócitos foi identificada aplicando os parâmetros expressão característica do antígeno pan-leucocitário CD45 (SSC / FL4) e SSC, onde a região inicialmente selecionada foi constituída das populações positivas “low” e “high” para o marcador CD45 e granulosidade inferior a 500 (Figura 5A, 5B). A seleção dessa subpopulação foi comum à análise de todos os fenótipos avaliados (Macrófagos, Linfócitos B, Linfócitos TCD4⁺ e Linfócitos TCD8⁺).

Para determinação da frequência de macrófagos (Figura 5) e linfócitos B (Figura 6), as subpopulações de interesse foram selecionadas a partir da análise combinada F4/80 FITC / SSC (FL1 / SSC) ou CD19 FITC / SSC (FL1 / SSC), respectivamente.

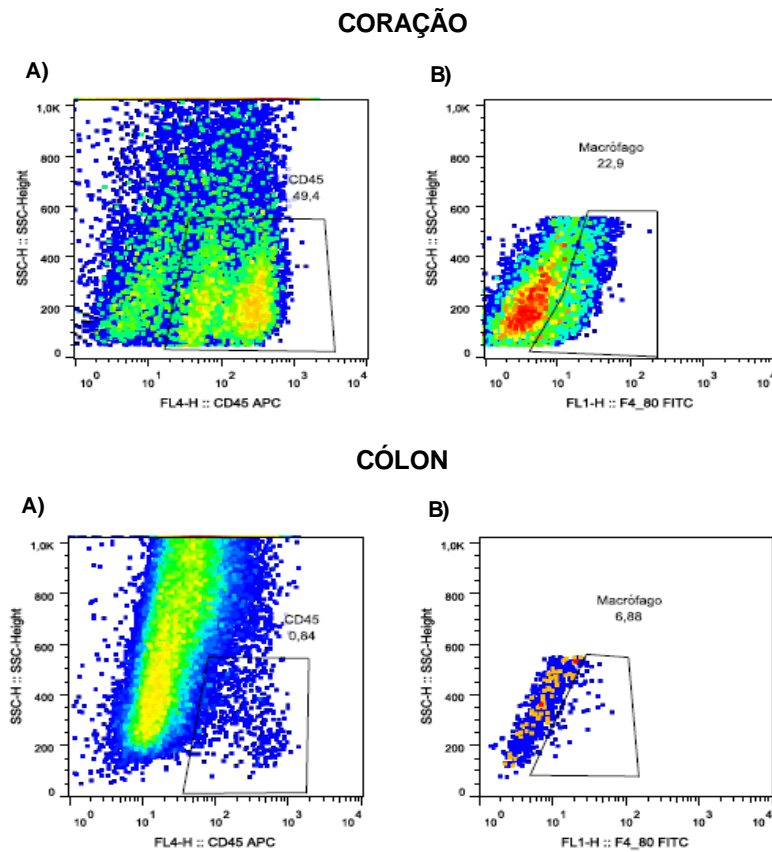


Figura 5: Representação da estratégia de análise da frequência de macrófagos em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*: (A) Gráfico de distribuição pontual FL4 (CD45 APC) versus Granulosidade (CSC) utilizado para a seleção da população de leucócitos – R1 (CD45). (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 (F4/80 FITC) versus SSC demonstrando a frequência da população de macrófagos (F4/80⁺).

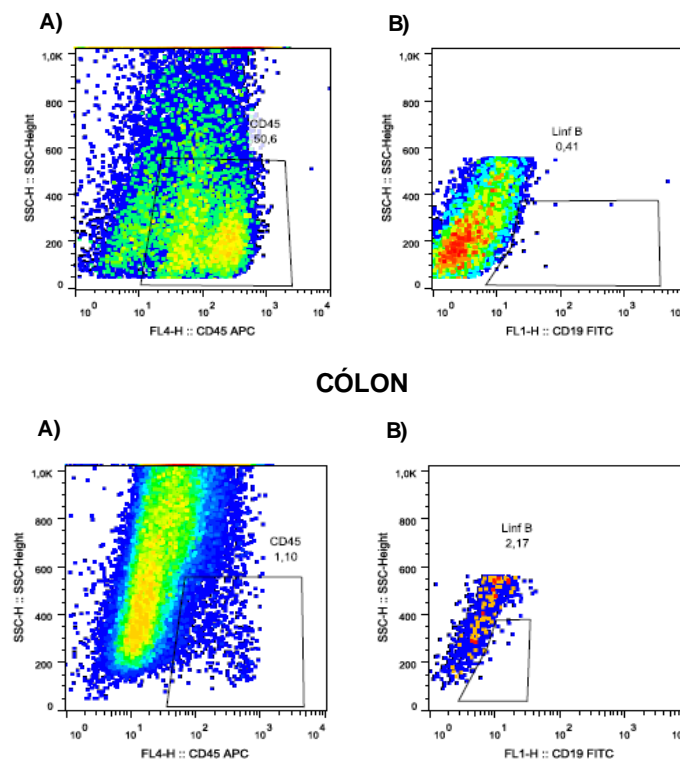


Figura 6: Representação da estratégia de análise da frequência de linfócitos B em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*: (A) Gráfico de distribuição pontual FL4 (CD45 APC) versus Granulosidade (CSC) utilizado para a seleção da população de leucócitos – R1 (CD45). (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 (CD19 FITC) versus SSC demonstrando a frequência da população de linfócitos B (CD19⁺). 20

As células com fenótipo de Linfócitos T foram definidas pela presença de expressão simultânea de CD45 APC e CD3 FITC, e a subpopulação foi selecionada em um gráfico de distribuição pontual CD3 FITC / SSC (FL1 / SSC) (Figura 10B). As frequências dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram ainda quantificadas em uma terceira combinação FSC / CD4⁺ PercP (FSC / FL3) ou FSC / CD8⁺ respectivamente (Figura 10C). Para avaliação funcional de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Figura 10D).

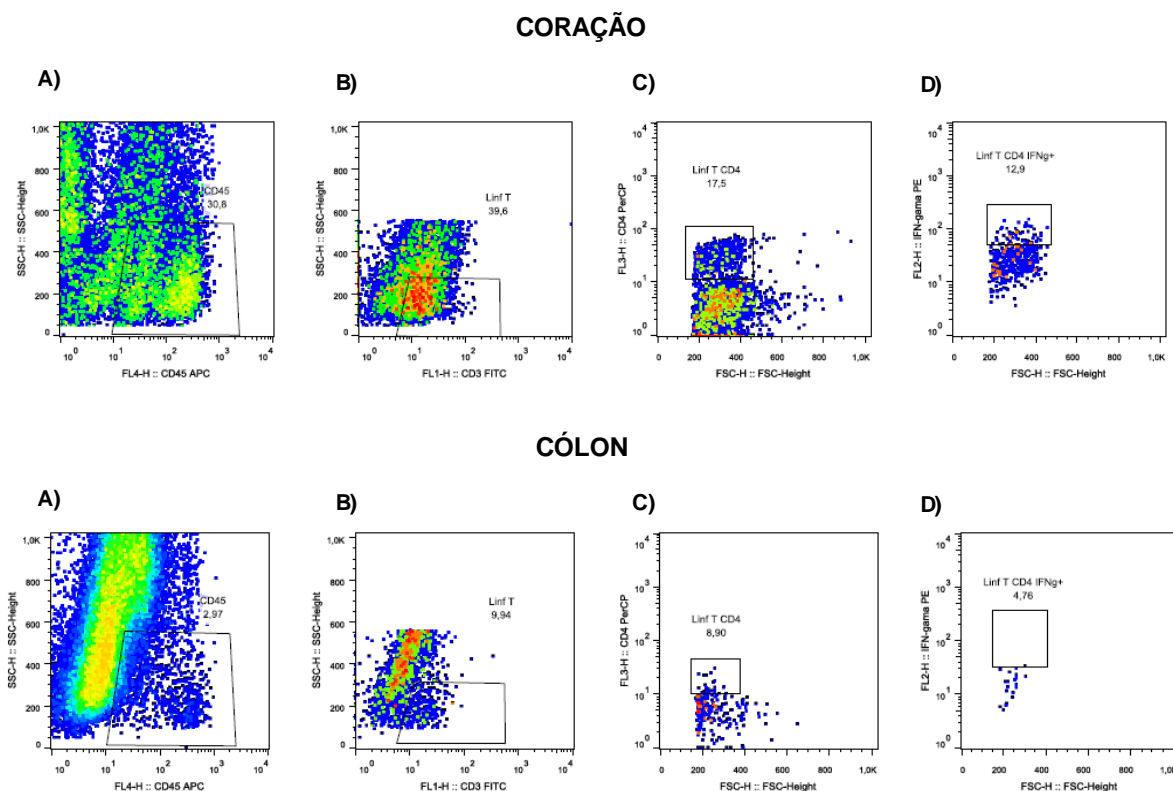


Figura 7: Representação da estratégia de análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, expressando IFN- γ em suspensão de células do coração ou cólon de camundongos infectados com o isolado Be-78is5-3mai, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*: (A) Gráfico de distribuição pontual FL4 (CD45 APC) versus Granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de leucócitos – R1 (CD45); (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 (CD3 FITC) versus SSC selecionando a população de interesse linfócitos T (CD3⁺); (C) Gráfico de distribuição pontual Tamanho (FSC) versus FL3 (CD4 PercP) demonstrando a frequência de linfócitos T CD4⁺; (D) Gráfico de distribuição pontual FSC versus FL2 (IFN- γ PE) demonstrando a frequência de linfócitos T CD4⁺.

4.4.3 Citocinas

a) ELISA

Fragmentos de coração e cólon com massa de aproximadamente 25 mg previamente coletados no momento da necropsia e armazenados em freezer -80°C foram obtidas para análise, utilizando o kit BD OptEIA™ Murine ELISA Set para as citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β . As amostras 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 x g durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram armazenados a -80°C antes da análise. Foram adicionados 100 μ L/poço de anticorpo de captura previamente diluído em tampão de cobertura. As placas foram incubadas *overnight*, a 4°C e em seguida lavadas 3 vezes em PBS / 0,05% Tween 20. Posteriormente adicionou-se 200 μ L de solução de bloqueio (PBS / 10% SFB)/poço, as placas foram incubadas por 1 hora, a 25°C e lavadas 3 vezes em PBS / 0,05% Tween 20. Para os poços destinados ao padrão, foram adicionados 100 μ L de solução de bloqueio, em duplicata. Nos outros poços foram adicionadas as amostras de tecido macerado. Em seguida adicionou-se 100 μ L de padrão ao primeiro poço e procedeu-se com a diluição seriada 1:2. O anticorpo de detecção foi diluído em solução de bloqueio e homogeneizado em vórtex; adicionou-se o reagente enzimático e homogeneizou-se novamente em vórtex; incubou-se por 15 minutos, à temperatura ambiente. Foi adicionado 100 μ L / poço. A placa foi incubada por 1 hora, a 25°C e lavada 7 vezes em PBS / 0,05% Tween 20. Adicionou-se 100 μ L do substrato por poço. As placas foram incubadas a 25°C até a formação da cor desejada, ou seja, até que o ponto mais concentrado do padrão atinja uma única leitura. O tempo de reação foi de aproximadamente 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando 50 μ L de H₂SO₄ 2N / poço e a leitura foi realizada a 450 nm pelo modelo SpectraMax® 384 Microplate Spectrophotometer from Molecular Devices LLC acoplado a um computador.

4.5 Componentes da MEC e Junções Comunicantes

4.5.1 Colágeno Tipo I e III

a) Técnica de Picrosírius Red (PS)

A técnica Picrosírius Red foi utilizada para caracterização e quantificação do colágeno tipo I e tipo III (reticular) por microscopia óptica associada a um sistema de lentes polarizadoras (MOURA *et al.*, 2009). 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. Os cortes histológicos foram submersos na solução de hematoxilina de Harris por 1,5min e lavados em água corrente por 30 min. Em seguida, foram incubados em solução de Picrosírius Red por uma hora e lavados em água corrente por 15 a 30s e levados à estufa a 56°C para secagem. Após completa secagem dos cortes, as lâminas foram montadas com o auxílio de Entellan e lamínula.

b) Quantificação do colágeno tipo I e III

Para quantificação do processo de neoformação de colágeno, as análises foram feitas utilizando a objetiva 5x e foram fotografadas, sob luz polarizada, 10 imagens aleatórias percorrendo todo o corte, totalizando uma área de aproximadamente $2,27 \times 10^7 \mu\text{m}^2$, por animal. As imagens foram digitalizadas através do microscópio óptico digital Leica DM5000B, microcâmara MC170HD com auxílio do programa Leica Application Suite (Versão 4.8), pertencentes ao LMU-MAM do NUPEB. Para a análise das imagens foi utilizado o programa Leica QWin V3. O processo de fibrose foi determinado pela diferença significativa ($p < 0,05$) entre a área de colágeno presente nos animais infectados pelo *T. cruzi* e aquele observado nos animais não infectados.

4.5.2 Laminina e Conexina-43

a) Imunofluorescência anti-laminina e anti-conexina-43

As amostras de coração e cólon, fixadas em Metanol/DMSO, foram processadas rotineiramente e incluídas em parafina. Cortes histológicos com 4 µm de espessura foram obtidos por microtomia e colocados em lâminas previamente silanizadas. Para avaliação *in situ*, foram imunomarcados componentes da matriz extracelular (laminina) e das junções comunicantes (conexina-43). Para as reações de imunofluorescência, foi utilizada uma metodologia adaptada de Barbosa *et al.*, (1999), onde os cortes foram submetidos a uma sequência de cinco banhos de PBS. Para reduzir as marcações inespecíficas, os cortes foram incubados com PBS suplementado com 10% de Albumina de Soro Bovino (*Bovine Serum*

Albumin-BSA) durante 60 minutos. Em seguida foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos diluídos em PBS/BSA 10%. Após 16 horas de incubação a 4°C, os cortes foram lavados em PBS e os anticorpos secundários marcados com fluorocromos foram adicionados com incubação por 60 minutos. Os cortes foram ainda incubados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride SIGMA-Aldrich, Steinheim, Alemanha) diluído em PBS/BSA 10% durante 60 minutos. As lâminas foram montadas com Hydromount (National Diagnostics, Atlanta, GA, U.S.A.) e armazenadas a 4°C. Para cada amostra foram realizados três tipos de controles negativos: a) cortes somente com DAPI (controle negativo), b) cortes incubados com IgG não específicos marcados com FITC ou PE (controle de isotipo) e, c) cortes incubados somente com os anticorpos secundários, para descartar a marcação inespecífica. Fragmentos de coração e **colon** (conexina-43 e laminina) foram utilizados como controles positivos da reação.

As imagens foram obtidas em microscópio confocal LSM 780 Zeiss pertencente ao LMU-MAM do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (NUPEB/UFOP). Os lasers disponíveis na configuração que foram usados para excitar as preparações são: laser Diodo/405nm, Argônio/488nm, Hélio-Neônio/633nm. A captura foi realizada utilizando-se filtros de emissão de acordo com o fluorocromo utilizado e listado no Tabela 3.

Tabela 3: Especificações dos anticorpos utilizados nos ensaios por microscopia confocal.

	Anticorpos	Especificações/Isotipo
Primários	Laminina (Abcam)	Rabbit anti-mouse/IgG
	Conexina-43 (Abcam)	Rabbit anti-mouse/IgG
Secundários-Fluorocromo	ALEXA FLUOR 647 (Abcam)	Goat anti-rabbit/IgG

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o apoio instrumental do *software* GraphPad Prism 8.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade, Shapiro-Wilk, sendo os dados considerados paramétricos. Para determinar as diferenças estatísticas entre os grupos

avaliados, foram utilizados o teste de variância Anova One-Way e pós-teste de Tukey. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram inferiores à 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Sobrevida

Para avaliar a taxa de sobrevida os animais foram acompanhados durante 90 dias após a infecção. Os animais infectados com a cepa Be-62 apresentaram mortalidade a partir do 16º DAI, sendo que, ao final de 30º DAI, a taxa de sobrevida foi de 0%. Animais infectados com o isolado ou com a cepa Be-78 parental apresentaram taxa de sobrevida de 100% até o final da avaliação (Tabela 4).

Tabela 4: Percentual de sobrevida dos animais não infectados e infectados com as cepas de referência, Be-62 e Be-78 parental, e com o isolado Be-78is do *Trypanosoma cruzi*.

Grupos	Sobrevida aos 30 DAI*	Sobrevida aos 90 DAI
NI	20/20 (100%)	20/20 (100%)
Be-62	0/20 (0%)	0/20 (0%)
Be-78	20/20 (100%)	20/20 (100%)
Be-78is	20/20 (100%)	20/20 (100%)

*: Dias após a infecção em que os animais do grupo Be-62 alcançaram 100% de mortalidade; NI: animais não-infectados; Be-62: animais infectados com a cepa Be-62; Be-78: animais infectados com a cepa Be-78 parental; Be-78is: Animais infectados com o isolado Be-78is; DAI: Dias após a infecção

5.2 Quantificação do parasitismo tecidual

Para quantificar a carga parasitária foi realizada a *qPCR* em amostras de coração e cólon e os dados estão apresentados na Figura 8. No coração, a maior carga parasitária foi observada nos animais infectados pela cepa Be-78 em relação aos animais infectados pelo isolado Be-78is. Já no cólon, embora tenha sido detectada carga parasitária superior em relação ao coração, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados.

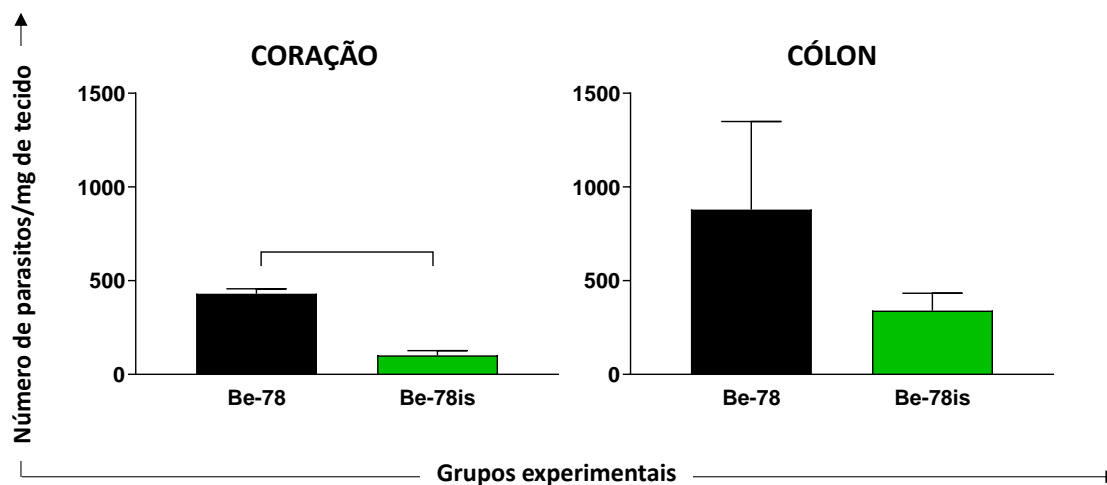


Figura 8: Avaliação da carga parasitária no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI) experimental com a cepa Be-78 parental (Be-78, ■) ou com o isolado Be-78is (Be-78is, ■). Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão. Grupos com $n=4$. As linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

5.3 Avaliação da resposta imune

5.3.1 Intensidade do processo inflamatório

Para quantificar o processo inflamatório, fragmentos de coração e cólon foram coletados durante a eutanásia dos animais, fixados, processados e feita a confecção das lâminas e corado pelo método de HE. No coração, houve um aumento do número de células inflamatórias nos animais infectados pelo isolado Be-78is em relação aos animais não infectados (Figura 9A e 9B). Já no cólon não foi observado diferenças entre os grupos avaliados (Figuras 9A e 9B).

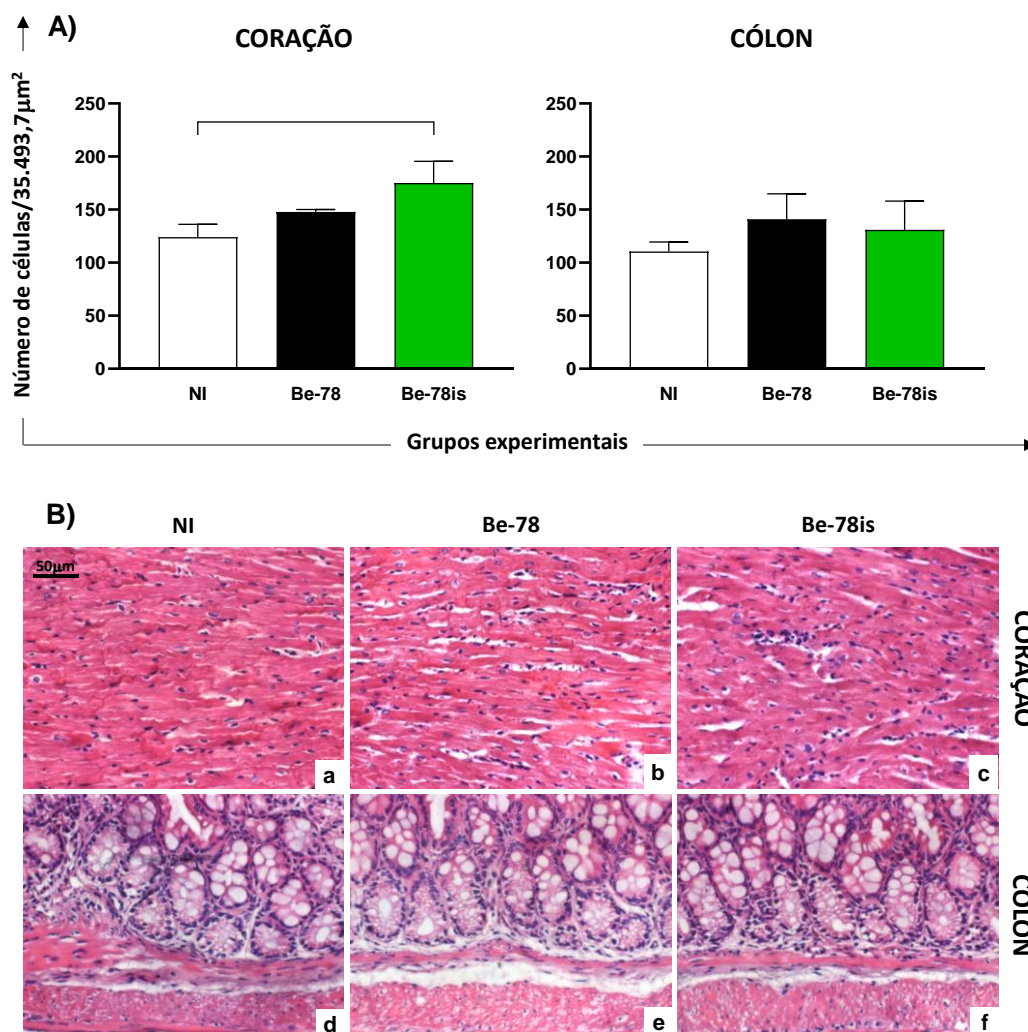


Figura 9: Análise histopatológica do processo inflamatório no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). A): Quantificação do infiltrado inflamatório nos animais não infectados (NI □), infectados com a cepa Be-78 parental (Be-78 ■) ou infectados com o isolado Be-78is (Be-78is ■). Os dados estão representados como Média ± Erro Padrão. Grupos com n=4. As linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. B): Fotomicrografias representativas da análise semi-quantitativa do processo inflamatório. Coração demonstrando aspecto histológico normal nos animais não infectados (a); poucas células inflamatórias com distribuição difusa em animais infectados com a cepa Be-78 parental (b); presença de infiltrado inflamatório multifocal de caráter discreto nos animais infectados pelo isolado Be-78is (c). Aspecto histológico compatível com a normalidade no cólon dos animais não infectados (d), infectados com a cepa Be-78 parental (e) ou infectados com o isolado Be-78is (f). Hematoxilina-Eosina. Barra= 50μm.

5.3.2 Perfil fenotípico do processo inflamatório

Foi realizada a caracterização fenotípica do infiltrado inflamatório no coração e cólon em suspensão celular, por meio da técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo e os resultados estão apresentados na figura 10.

A análise da presença de macrófagos no tecido muscular cardíaco revelou aumento no percentual dessas células nos animais infectados com o isolado Be-78is em relação aos animais não infectados (Figura 10).

Em relação aos Linfócitos B, no coração foi observado um aumento no percentual dessas células nos animais infectados pelo isolado Be-78is em relação aos animais infectados pela cepa Be-78 parental e aos animais não infectados.

Na avaliação da frequência relativa de linfócitos TCD4⁺ no coração, foi possível observar aumento dessas células em ambos os grupos infectados, Be-78 e Be-78is, em relação ao grupo não infectado, e ainda, um percentual superior de células T auxiliares nos animais infectados com o isolado Be-78is quando comparado aos animais infectados com a cepa Be-78 parental (Figura 10).

Ainda no coração, animais infectados com o isolado Be-78is apresentaram aumento significativo no percentual de linfócitos T CD8⁺ quando comparados aos animais não infectados e infectados com a cepa Be-78 parental (Figura 10).

Não foram encontradas diferenças significativas no percentual dos fenótipos celulares avaliados no cólon dos grupos estudados (Figura 10).

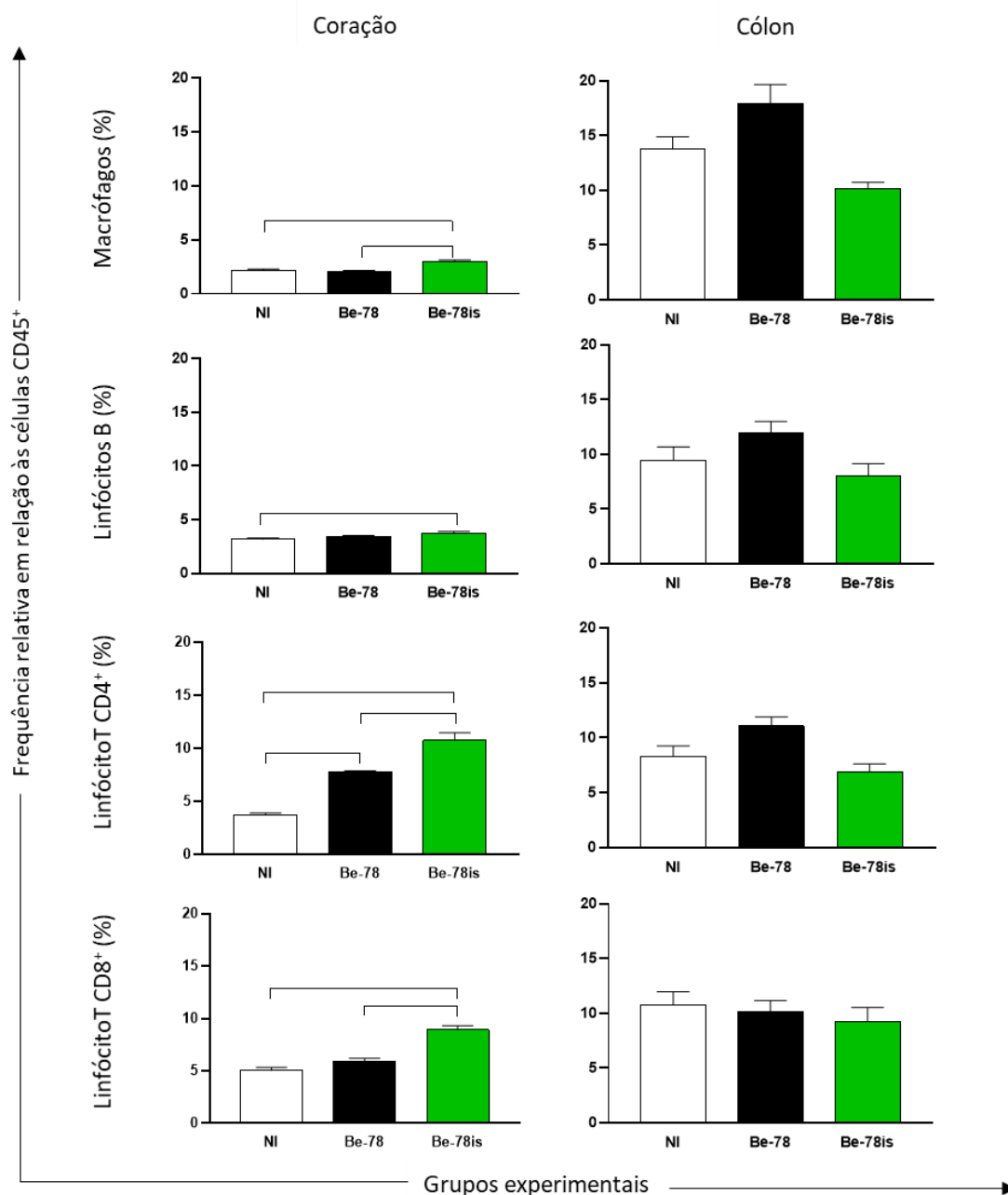


Figura 10: Análise imunofenotípica do percentual médio de macrófagos (CD45+ F4/80+), linfócitos B (CD45+ CD19+), linfócitos T CD4+ (CD45+ CD3+ CD4+) e linfócitos T CD8+ (CD45+ CD3+ CD8+) no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão. Cada um dos 4 elementos do grupo foi composto por *pool* de órgãos (coração ou cólon) de 4 animais. NI (□): grupo de animais não-infectados; Be-78 (■): grupo de animais infectados com a cepa Be-78 parental; Be-78 isolado (■): grupo de animais infectados com o isolado Be-78is. As linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

5.3.3 Avaliação dos níveis de citocinas

Para a avaliação da resposta imune no coração e cólon durante a infecção por subpopulações do *T. cruzi*, além do fenótipo celular, foi analisado o microambiente de citocinas por meio da técnica de ELISA.

Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de IFN- γ em macerados de coração e cólon entre os grupos avaliados (Figura 11). Diferente do observado para IFN- γ , os níveis da citocina reguladora, IL-10, foram significativamente superiores no coração dos animais infectados com o isolado em relação ao detectado no coração dos animais não infectados (Figura 11). Em relação aos dados da citocina TGF- β , nos animais infectados com ambas as subpopulações do *T. cruzi* não foram encontradas diferenças significativas em relação ao grupo controle tanto no coração e cólon, como mostra a figura 11.

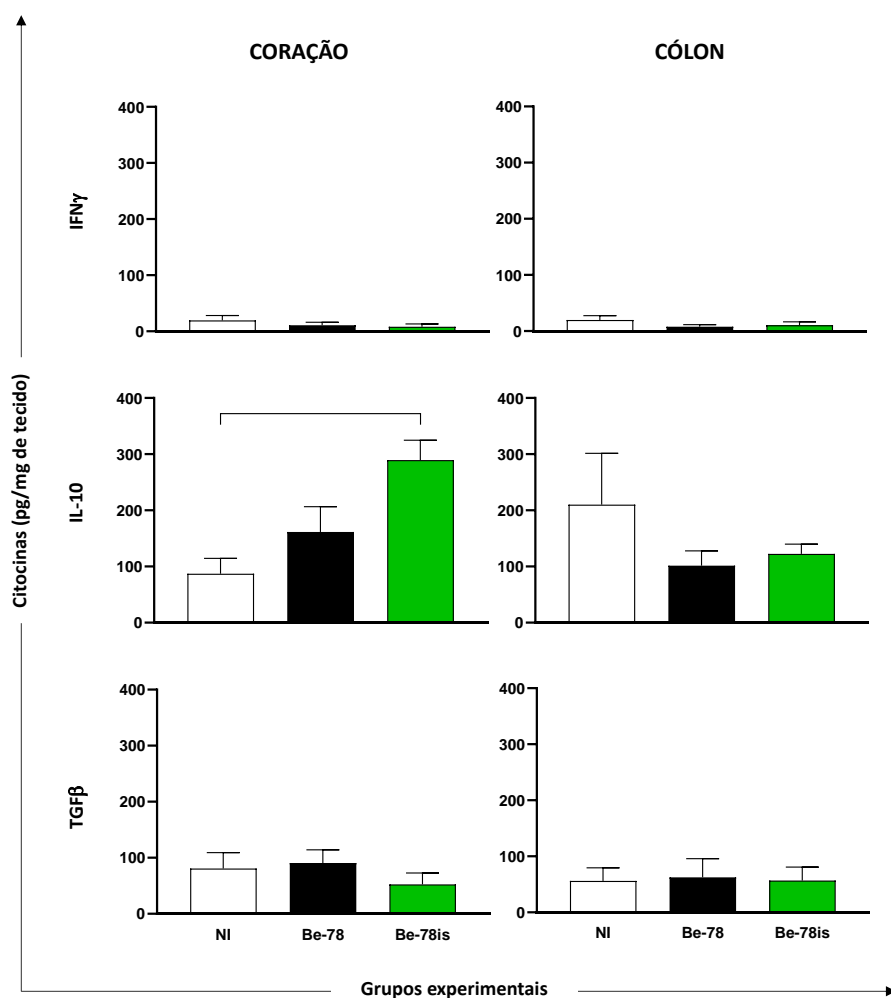


Figura 11: Análise dos níveis das citocinas IFN γ , IL-10 e TGF β no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão. Grupos com $n=4$. NI (\square): grupo de animais não-infectados; Be-78 (\blacksquare): grupo de animais infectados com a cepa Be-78 parental; Be-78is (\blacksquare): grupo de animais infectados com o isolado Be-78is. As linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

5.4 Quantificação dos componentes da MEC e das junções comunicantes

5.4.1 Análise do processo de neoformação de colágeno

Para quantificar o processo de fibrose, cortes histológicos de coração e cólon foram corados pelo método de Picrosirius, no qual, sob luz polarizada, foram determinados os colágenos tipo I (vermelho e amarelo) e III (verde), sendo essa análise importante componente nas formas clínicas, como a insuficiência cardíaca e megacolon da fase crônica da DCh

No coração, houve aumento de colágeno tipo I nos animais infectados pela cepa Be-78 em relação aos animais não infectados, como mostra a figura 12A. Já no cólon não foram observadas diferenças significativas nos animais infectados em relação o grupo controle (Figura 12A e 12B). O mesmo foi observado para análise de colágeno tipo III, para o qual tanto no coração, quanto no cólon, não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figura 12A e 12B).

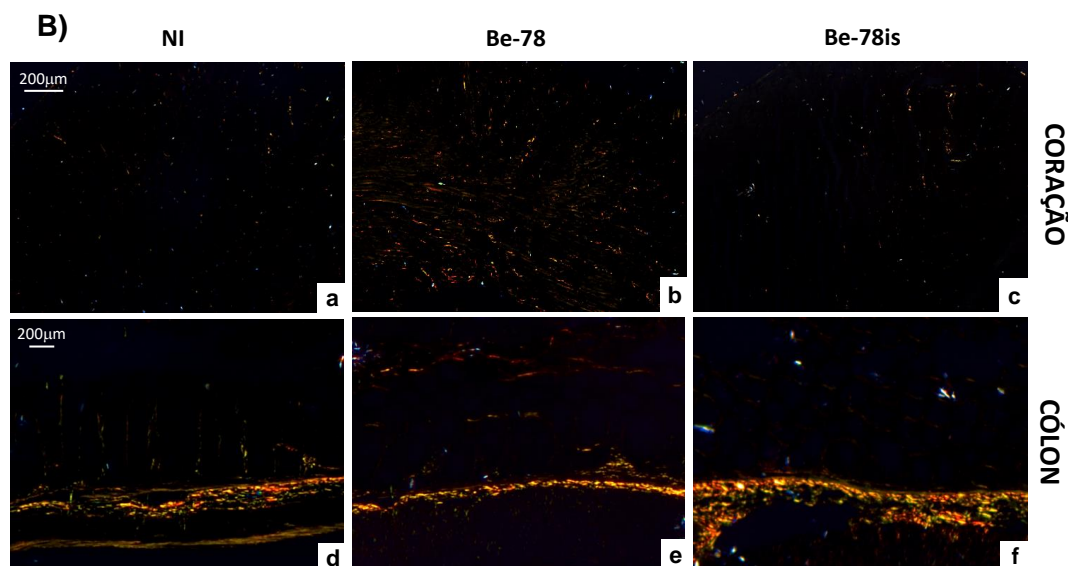
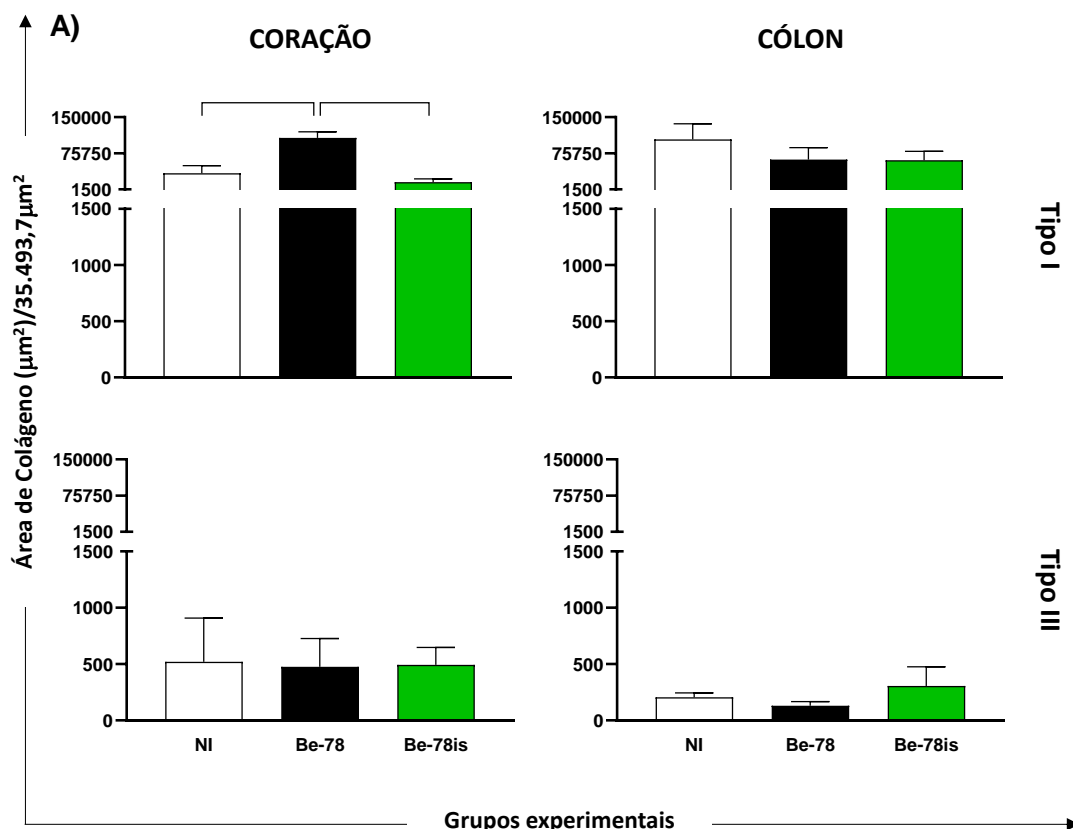


Figura 12: Análise histopatológica do processo de neoformação de colágeno no coração e cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). **A):** Quantificação da área de fibras colágenas do tipo I e III nos animais não infectados (NI □), infectados com o isolado Be-78is (Be-78is ■) ou infectados com a cepa Be-78 parental (Be-78 ■). Os dados estão representados como Média ± Erro Padrão. Grupos com $n=4$. As linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais. **B):** Fotomicrografias representativas da análise das fibras colágenas tipo I (vermelha e amarela) e tipo III (verde). Coração demonstrando aspecto histológico normal nos animais não infectados (a) e infectados com o isolado Be-78is (c); aumento de colágeno tipo I (vermelho) em animais infectados com a cepa Be-78 parental (b). Aspecto histológico compatível com a normalidade no cólon de animais não infectados (d), infectados com a cepa Be-78 parental (e) ou com o isolado Be-78is (f). Picrosírius Red. Barra= 200µm.

5.4.2 Avaliação morfométrica da laminina

A laminina é um dos principais componentes da MEC e está estabelecido na literatura que a infecção pelo *T. cruzi* induzem alterações moleculares nos elementos da MEC. Para quantificar a laminina, foi feito pelo método de imunofluorescência em microscopia confocal no qual foram marcados por anti-laminina com seu respectivo anticorpo secundário com fluorocromo.

Não foi observado diferenças significativas na intensidade média de fluorescência para laminina entre os grupos avaliados no coração (Figura 13A e 13B). O mesmo padrão foi observado nos grupos avaliados no cólon (Figura 14A e 14B).

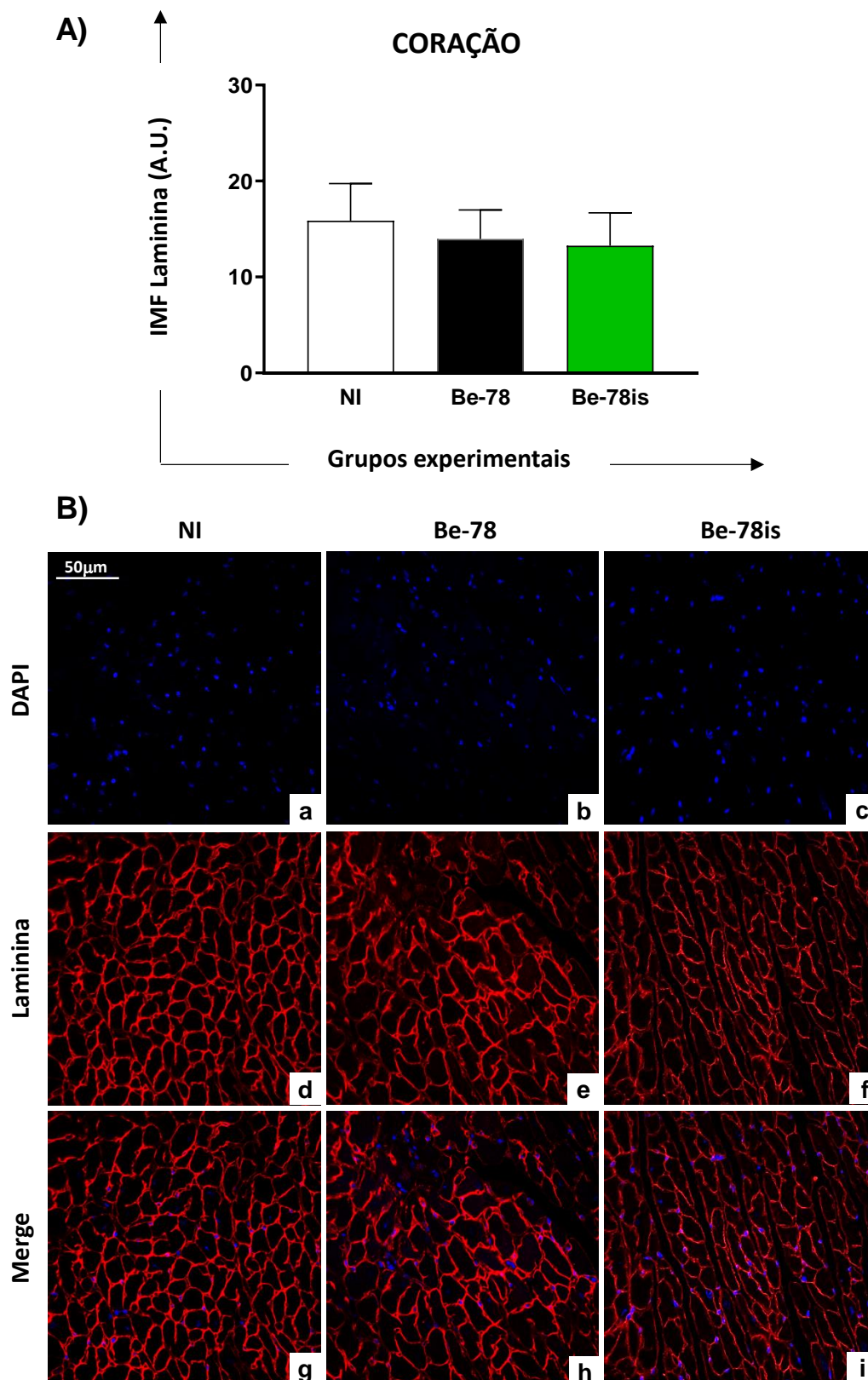


Figura 13: Avaliação morfológica do componente da MEC, laminina, no coração de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). **A):** Avaliação da intensidade média de fluorescência para laminina nos animais não infectados (NI □), infectados com o isolado Be-78is (Be-78is ■) ou infectados com a cepa Be-78 parental (Be-78 ■). Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão. Grupos com $n=4$. **B):** Fotomicrografias de coração demonstrando distribuição normal de laminina nos animais não infectados (**a, d, g**), infectados com a cepa Be-78 parental (**b, e, h**) ou com o isolado Be-78is (**c, f, i**). Imunofluorescência anti-laminina. Laminina (vermelho); núcleos celulares (azul/DAPI). Barra=50 μ m.

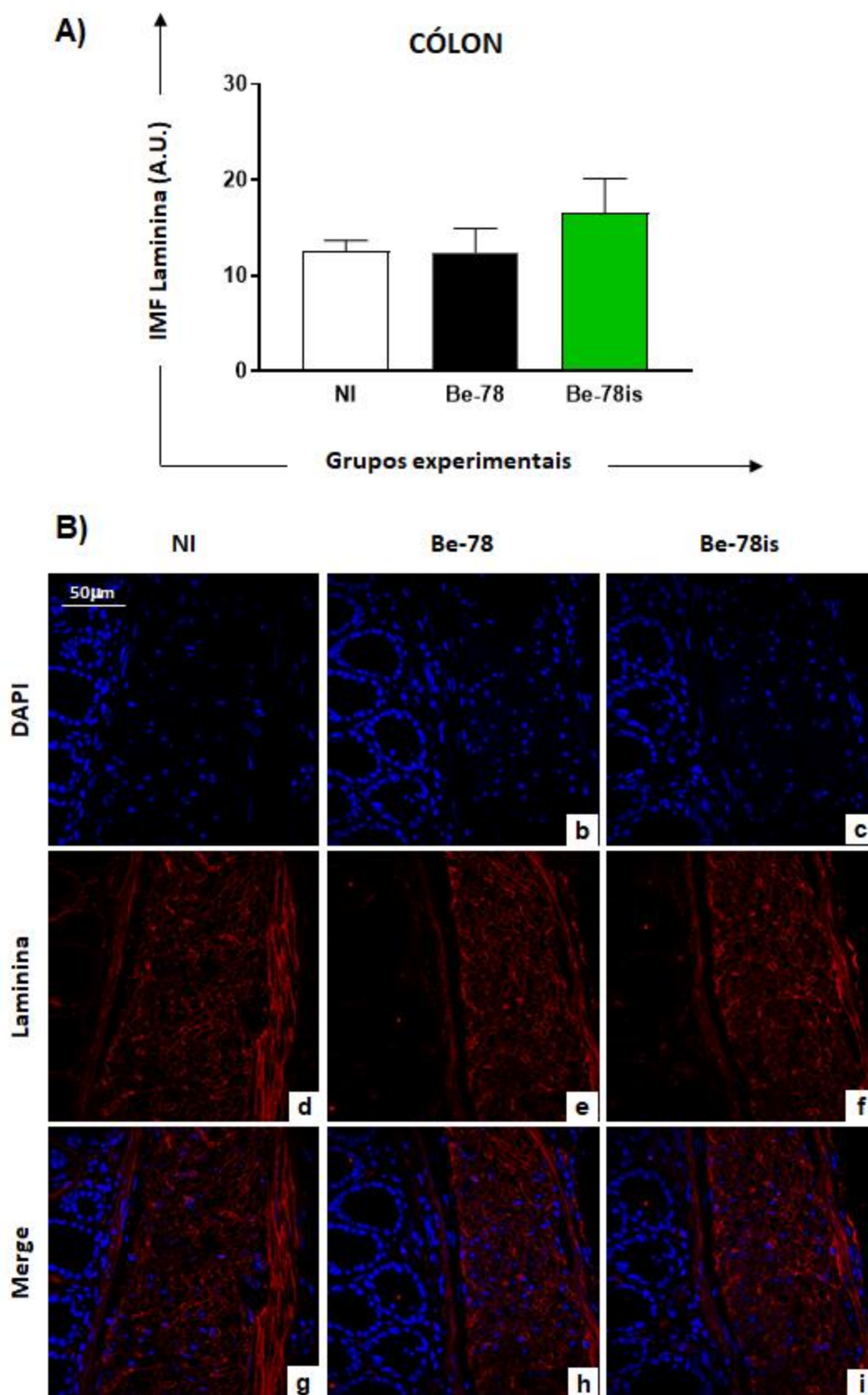


Figura 14: Avaliação morfológica do componente da MEC, laminina, no cólon de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). **A):** Avaliação da intensidade média de fluorescência para laminina nos animais não infectados (NI □), infectados com o isolado Be-78is (Be-78is ■) ou infectados com

a cepa Be-78 parental (Be-78 ■). Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão. Grupos com $n=4$. **B):** Fotomicrografias de cólon demonstrando distribuição normal de laminina nos animais não infectados (**a, d, g**), infectados com a cepa Be-78 parental (**b, e, h**) ou com o isolado Be-78is (**c, f, i**). Imunofluorescência anti-laminina. Laminina (vermelho); núcleos celulares (azul/DAPI). Barra= 50 μ m.

5.4.3 Avaliação morfológica da conexina-43 no coração

Uma das complicações da insuficiência cardíaca na DCh é causada pela alterações das junções comunicantes (gap) pela infecção do T.cruzi nos cardiomiócitos. A conexina 43 é um dos principais componentes das junções comunicantes no coração e sua análise foi feita pela técnica de imunofluorescência em microscopia confocal no qual foram marcados por anti-conexina 43 com seu respectivo anticorpo secundário com fluorocromo.

Em ambos os grupos infectados não foi possível observar diferentes expressões na intensidade média de fluorescência para conexina-43 no coração (Figura 15A e 15B).

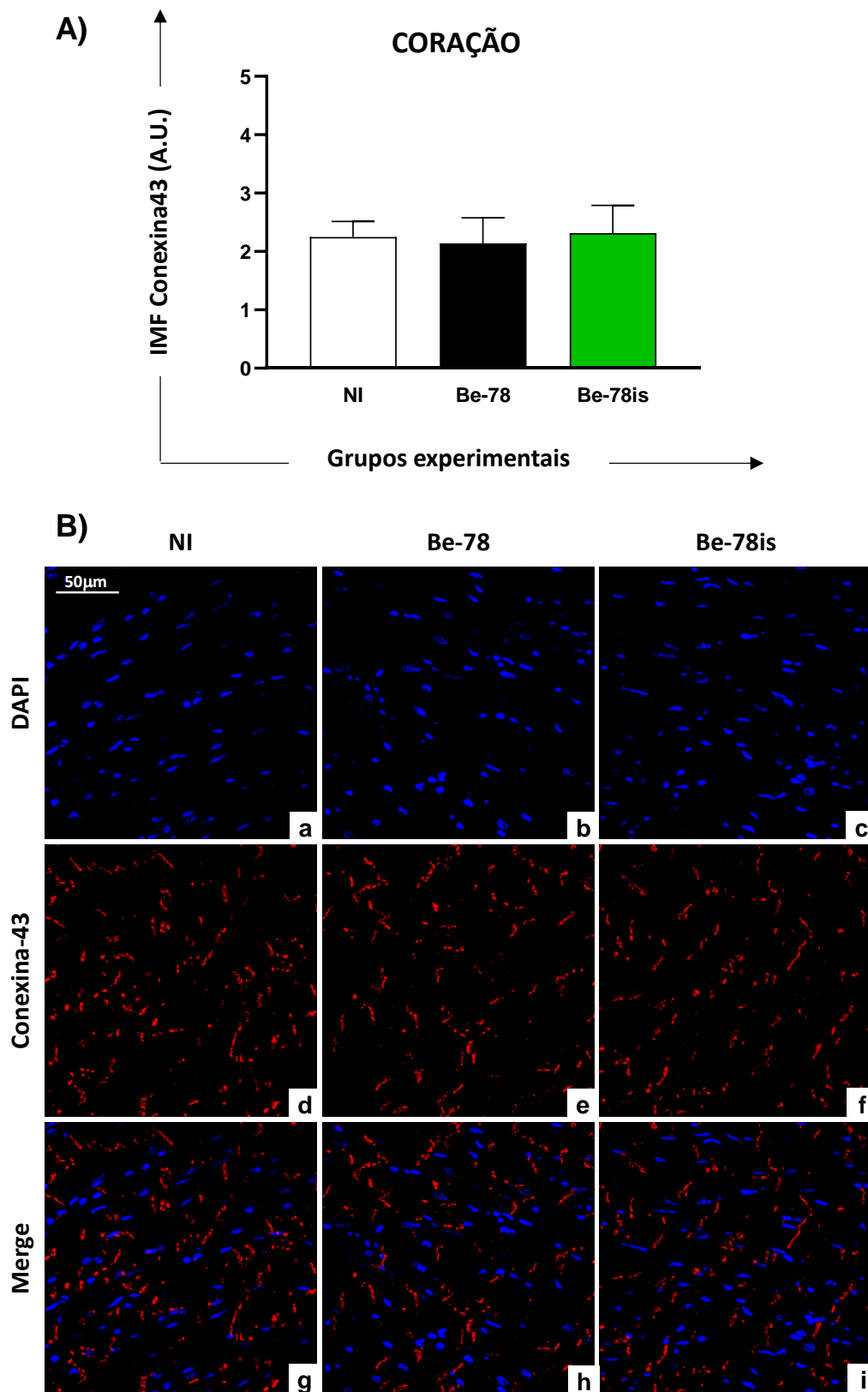


Figura 15: Avaliação morfológica de conexina-43 no coração de camundongos BALB/c necropsiados aos 90 dias após a infecção (DAI). A): Avaliação da intensidade média de fluorescência para conexina-43 nos animais não infectados (NI □), infectados com a cepa Be-78 parental (Be-78 □) ou infectados com o isolado Be-78is (Be-78is □). Os dados estão representados como Média \pm Erro Padrão. Grupos com $n=4$. B): Fotomicrografias de coração demonstrando a distribuição normal de conexina-43 entre os cardiomiócitos nos animais não infectados (a, d, g), infectados com a cepa Be-78 parental (b, e, h) ou com o isolado Be-78is (c, f, i). Imunofluorescência anti-conexina-43. Conexina-43 (vermelho); núcleos celulares (azul/DAPI). Barra= 50 μ m.

6. DISCUSSÃO

Muito se discute sobre novas estratégias terapêuticas na doença de Chagas, mas a grande questão é que pouco se conhece sobre a relação parasito-hospedeiro, bem como a plasticidade do parasito e as cepas policlonais existentes, que podem estar relacionadas à evolução dos casos clínicos como a cardiomiopatia e os megas chagásicos. Sendo assim, são muito importantes estudos para compreender a biologia do parasito, bem como a sua relação com o hospedeiro e o que pode levar a esses diversos casos clínicos na fase crônica da doença.

Este trabalho é uma continuação de uma linha de pesquisa do nosso grupo no qual observou a influência da infecção por uma cepa policlonal e uma de suas subpopulações, isolada na fase crônica recente, sobre a resposta imune durante a fase aguda da DCh experimental. Em anexo, figuras (9.2 e 9.3) representativas do resumo dos dados obtidos de coração e cólon por Nogueira-Paiva (2015) em sua tese de doutorado, no qual foram usados como comparativo neste trabalho para análises da evolução da infecção da fase aguda para a fase crônica. Os dados obtidos nesse trabalho confirmaram características moleculares e perfis de histotropismo distintos para as cepas Be-62 e Be-78, embora essas cepas pertençam ao mesmo DTU (Tc II), e o isolado Be-78is compartilhando características de histotropismo com a cepa Be-62 e virulência com a cepa Be-78 parental (Nogueira-Paiva et al., 2015). Neste sentido, o grupo levantou a seguinte hipótese: como seria esta relação cepa-isolado na fase crônica da doença de Chagas?

Já é bem descrito na literatura que a cepa Be-62 é uma cepa virulenta e que apresenta altas taxas de parasitemia, podendo ser relacionada a formas mais delgadas e assim consegue invadir a célula e replicar mais rápido (Lana e Chiari, 1986; Lana, 1981; Guedes et al, 2007). Com isso, todos os animais infectados por esse cepa apresentaram taxa de 100% de mortalidade aos 90DAI como esperado .

Sabe-se que o isolado Be-78is, que foi selecionado da cepa policlonal Be-78, compartilha características semelhantes à cepa Be-62, como por exemplo, o histotropismo preferencial pelo cólon durante a fase aguda da infecção, em contrapartida ao cardiomiotropismo observado para a cepa Be-78 parental (Nogueira-Paiva et al., 2015). De acordo com nossos dados, na fase crônica, há uma maior carga parasitária no coração dos animais infectados com a cepa Be-78 parental, o que se assemelha aos dados obtidos no laboratório na fase aguda (Nogueira-Paiva et al., 2015) mostrando que o cardiomiotropismo se mantém também na fase crônica da doença. Em ambos os grupos infectados, há um

aumento de parasitos no cólon, o que confirma os dados atuais da literatura, no qual o TGI mostrou ser o principal foco de infecção na fase crônica em diversos modelos estudados (Lewis et al., 2016). Estudos realizados por Veloso et al., (2012) utilizaram cães da raça Beagle infectados com as cepas Be-78 e Y (pertencentes ao mesmo DTU TcII) que foram submetidas por tempos de passagens diferentes no biotério (um inóculo mantido por 4 passagens e outro inóculo oriundo de uma cepa mantida no biotério por 18 meses) para verificar a se dinâmica de passagem ao longo do tempo pré-dispõem alterações nas cepas. Os resultados mostram que cada cão selecionou uma determinada população, ou seja, essa observação relaciona não apenas a genética do *T. cruzi*, mas também o hospedeiro (Veloso et al., 2012). Nossos dados mostram que mesmo utilizando um isolado que apresentou características moleculares semelhantes de ambas as cepas (Be-62 e Be-78 parental), na fase aguda (Nogueira-Paiva et al., 2015), na fase crônica o isolado apresentou características de patogenicidade semelhante à cepa parental e sendo que essa complexidade da interação parasito-hospedeiro mostrou o isolado apresentando características menos patogênicas do que a parental. Além disso, um estudo feito em cães chagásicos crônicos por Veloso, et al (2005) avaliando a influência da infecção a longo prazo pelo *T. cruzi* em relação ao hospedeiro vertebrado utilizando a cepa Be-78 e seus respectivos isolados, mostrou que os isolados podem responder de formas distintas em relação a cepa parental. Essas alterações podem estar relacionadas à relação parasito-hospedeiro, no qual o *T. cruzi* pode modular a infecção.

Foi observado aumento do número de células inflamatórias nos animais infectados pelo isolado Be-78is no coração, sugerindo que essa inflamação possa ser importante para a redução do parasitismo tecidual desses animais. Já nos animais infectados pela cepa Be-78, mesmo na presença de maior carga parasitária no coração, a resposta imune permaneceu em homeostase. De Lana, Chari & Tafuri 1992 mostraram que cães SRD (sem raça definida) infectados pela cepa Be-78 apresentaram cardiopatia chagásica crônica fibrosa difusa e, além disso, avaliaram a influência da infecção a longo prazo da cepa Be-78 do *T. cruzi*, isolados de cães crônicos cardíacos e indeterminados, em camundongos e mostraram que a infecção levou a alterações biológicas, como parasitemia, patogenicidade e virulência nesse modelo, concluindo ao longo da infecção a resposta parasito-hospedeiro se modifica. Neste contexto, é possível perceber que além das cepas de *T. cruzi* apresentarem polimorfismo biológico, também apresentam uma importante característica de plasticidade frente ao hospedeiro, podendo ser modulada ao longo da infecção. Neste trabalho, o modelo utilizado apresentou

diferentes características de patogenicidade entre os animais infectados pelo isolado Be-78is e pela cepa Be-78 parental, comparados, por exemplo, ao modelo cão (De Lana, Chari & Tafuri, 1992), podendo relacionar a capacidade de modulação genética do *T. cruzi* em relação parasito-hospedeiro e conseqüentemente as formas clínicas da doença. Fazendo um comparativo entre a carga parasitária e processo inflamatório observado no isolado e na cepa Be-78 parental, foi possível observar nos animais infectados pela cepa Be-78 parental uma maior carga parasitária, porém sem aumento do número de células inflamatórias, sugerindo que esses parasitos possam estar “quiescentes” nesse tecido (Tarleton, 2003; Tarleton, 2007). Já nos animais infectados pelo isolado foi observado um aumento do número de células inflamatórias no coração, sugerindo que essa inflamação possa estar relacionado na redução do parasitismo tecidual observado nesses animais.

Além da intensidade da inflamação, também avaliamos o fenótipo das células inflamatórias e o microambiente de citocinas presentes no coração e cólon dos animais, sendo de fundamental importância para compreendermos a dinâmica da infecção pelo *T. cruzi* e identificar possíveis alvos terapêuticos. Em relação ao número de macrófagos, foi possível observar aumento dessa célula nos animais infectados pelo isolado Be-78is no coração, o que contribuiu para o aumento do processo inflamatório nesse mesmo grupo. Na fase aguda, Nogueira-Paiva (2015), observou um aumento tardio no número de macrófagos no 28º DAI no coração que se manteve durante a fase crônica recente, sugerindo mais uma vez que a inflamação poderia ser fator importante na diminuição do parasitismo tecidual nesses animais. Sabe-se que os macrófagos são essenciais para o controle da infecção pelo *T. cruzi*, por produzirem substâncias citotóxicas como, por exemplo, o NO (Muñoz-Fernández, Fernández & Fresno 1992; Alvares et al, 2011). Estudos feitos por Chowdhury et al., (2017) isolando micropartículas de sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico de humanos infectados (fase crônica) e posteriormente utilizando modelo camundongo para investigar a participação dessas micropartículas frente a resposta imune, concluíram que as micropartículas produzidas por células imunes são capazes de ativar macrófagos pró-inflamatórios em camundongos, bem como liberação de citocinas e NO. Essa continuidade na ativação de macrófagos na fase crônica recente pode ser importante para a manutenção do controle do parasitismo tecidual, podendo, no caso dos nossos animais, estar exercendo um papel protetor em relação ao desenvolvimento de lesões no coração.

Além dos macrófagos, os linfócitos B, células da resposta imune humoral, também são importantes no combate à infecção pelo *T. cruzi* por produzir anticorpos e citocinas que

ativam as células T. Nesse trabalho houve um aumento no número de linfócitos B no coração dos animais infectados pelo isolado Be-78is em relação aos animais infectados pela cepa Be-78 e aos animais não infectados. Na fase aguda, houve aumento do número de linfócitos B no 14º DAI em todos os animais infectados, porém apenas o grupo infectado pela cepa Be-78 permaneceu aumentado no 28º DAI no coração (Nogueira-Paiva, 2015). Na fase aguda tem maior percentual de linfócitos B no coração nos animais infectados pela cepa Be-78 parental, mas quando observamos a fase crônica o isolado Be-78is apresenta maior percentual de linfócitos B no coração. Assim, fazendo uma relação entre a fase aguda e crônica, podemos perceber que o isolado apresenta um atraso na resposta imune humoral em relação os animais infectados pela cepa parental, que é importante na produção de anticorpo, controle de parasitos, ativação de mecanismos imunológicos eficazes que contribuem para o estabelecimento contra as formas clínicas da doença, associados a propriedades protetoras. Passos *et al.*, (2019) investigaram a relação entre as subpopulações de células B para as diferentes formas clínicas da DCh e os resultados encontrados foram aumento de células B em pacientes que apresentaram sorologia positiva, porém exames de imagem normal (forma indeterminada), no qual essas células B expressaram TNF e a citocina anti-inflamatória IL-10, sugerindo que este equilíbrio imunológico é importante fator na ação protetora como prevenção das formas clínicas da doença (Passos *et al.*, 2019). Neste trabalho, resultados semelhantes foram encontrados, no qual houve o aumento de células B no coração dos animais infectados pelo isolado Be-78is, bem como citocina anti-inflamatória IL-10 e não foi observado danos teciduais, corroborando com os dados encontrados na literatura.

Na fase aguda, as células B desempenham um papel importante na manutenção das células T, bem como a funcionalidade na produção de citocinas pro-inflamatórias, o que pode resultar em uma resposta eficiente ou não e assim prolongar a infecção, levando o indivíduo a fase crônica e possíveis complicações cardíacas ou digestivas (Cardillo *et al.*, 2007). Neste trabalho, foi possível observar presença de fibrose apenas nos animais infectados pela cepa Be-78 parental no coração, indicando que o intenso processo inflamatório observado na fase aguda foi capaz de gerar uma lesão observada na fase crônica recente. Para os animais infectados pelo isolado Be-78is, mesmo ainda permanecendo o processo inflamatório na fase crônica recente, não é possível observar danos teciduais, sendo necessária uma análise de fase crônica mais tardia.

Em relação aos linfócitos TCD4⁺, nesse trabalho, houve um aumento significativo no percentual dessas células nos animais infectados pelo isolado Be-78is no coração em relação

àqueles infectados com a cepa Be-78 parental e não infectados, mostrando mais uma vez que essas células foram capazes de contribuir para a redução da carga parasitária nesses animais. Além disso, os animais infectados pela cepa Be-78 parental também apresentaram maior percentual de linfócitos TCD4⁺ em relação os animais não infectados, no entanto esse aumento não foi capaz de gerar um intenso processo inflamatório. Esse fator também pode estar relacionado às amastigotas dormentes que não se proliferam no tecido e assim não causando importante ativação de resposta imune nesses animais (Sánchez-Valdéz, & Padilla, 2019). Sabe-se que as células TCD4⁺ são responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, importantes para a manutenção da resposta imune em indivíduos portadores da doença de Chagas, bem como para a evolução para as formas clínicas da fase crônica. Dados na literatura mostram que pacientes indeterminados e portadores de CCC apresentaram maior percentual de linfócitos TCD4⁺ no sangue periférico, sugerindo que essa célula atua de forma antígeno específico, bem como promove a regulação da resposta imune efetora (Araújo, 2009). Os mesmos dados foram encontrados por Chaves *et al.*, (2016) no qual pacientes acometidos por CCC e pacientes indeterminados apresentaram aumento significativo de células TCD4⁺ e TCD8⁺.

Na análise de imunofenotipagem para linfócitos TCD8⁺ foi encontrado aumento dessas células nos animais infectados pelo isolado Be-78i no coração em relação os animais não infectados. Todas as células imunes avaliadas nesse trabalho apresentaram aumento significativo no grupo isolado Be-78is, podendo relacionar a diminuição da carga parasitária desse grupo no coração. Na fase aguda houve um aumento do percentual de células TCD8⁺ aos 28 DAI em ambos os grupos infectados no coração, enquanto, no cólon, esse aumento se manteve apenas nos animais infectados pelo isolado Be-78is (Nogueira-Paiva, 2015). Sabe-se que as células TCD8⁺ podem influenciar na gravidade das lesões causadas, principalmente no tecido cardíaco, desenvolvendo as formas graves e complicações causadas pela presença do parasito no tecido, porém, os resultados desse trabalho mostraram que esse aumento de TCD8⁺ nos animais infectados pelo isolado não foi capaz de causar danos teciduais expressivos na fase crônica recente e com isso seria necessário acompanhar esses animais por mais tempo para compreender melhor o impacto da manutenção do processo inflamatório ao longo da infecção pelo isolado Be-78is.

Em geral, na fase aguda, a resposta imune eleva os níveis tanto de linfócitos TCD4⁺ quanto de TCD8⁺, já na fase crônica da infecção os níveis de células T se tornam imunomoduladas, acompanhados de uma baixa resposta imune efetora, devido à inativação

dessas células por receptores inibitórios ou imunorreguladores (Mateus, et al., 2019). Nesse trabalho, os animais infectados pelo isolado Be-78is apresentam perfil inflamatório de resposta imune celular como observado na fase aguda, diferente do observado nos animais infectados pela cepa Be-78 parental. Assim, a ausência de fibrose nos animais infectados pelo isolado Be-78is pode estar relacionado ao fato de induzir uma resposta duradoura, porém sem a capacidade de causar lesão, enquanto os animais infectados pela cepa Be-78 parental, induziu uma intensa inflamação no coração na fase aguda, que foi controlada na fase crônica, no entanto causou dano tecidual que foi reparado por fibrose. Tanto as células TCD4⁺ e TCD8⁺ são essenciais para delinear o papel da resposta imune frente a uma infecção, como por exemplo, o desenvolvimento ou não das formas clínicas da DCh. De modo geral, os linfócitos T são importantes componentes observados em indivíduos indeterminados e cardíacos, além disso, as células T ativas expressam citocinas inflamatórias e inflamatórias, consistindo em uma imunorregulação do sistema imune durante a fase crônica (Dutra, & Gollob, 2008) corroborando com este trabalho, no qual os animais infectados pelo isolado Be-78is, mostraram essa característica de imunorregulação do sistema imune. Tarleton et al., (1994) observaram que camundongos knockout para TCD4+ e/ou TCD8 + na fase crônica, apresentaram um aumento da inflamação, acompanhada de alta carga parasitária, sugerindo que a depleção de subconjuntos de células T não impede a resposta inflamatória, porém não é capaz de diminuir a carga parasitária. Nossos dados mostram que o aumento observado de linfócitos TCD4 + e TCD8 + foram importantes no controle do parasitismo tecidual observados nos animais infectados pelo isolado Be-78is no coração.

Em relação às citocinas avaliadas nesse trabalho, não houve aumento de IFN- γ e TGF- β em ambos os grupos infectados, tanto no coração quanto no cólon. Diversas células imunes produzem IFN- γ , pois essa citocina atua na ativação de células responsáveis pela eliminação do parasito. Animais nocautes para IFN- γ são mais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* por torná-los incapazes de atuar no controle da infecção do parasito, pelo fato de IFN- γ ser essencial na montagem e ativação da resposta imune e na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Almeida, 2017). Estudos relacionados em indivíduos soropositivos na fase crônica da DCh, apresentaram níveis elevados de IFN- γ , porém não foi observado diferença estatística em relação do grupo controle (Pissetti *et al*, 2009), sendo nesse trabalho, também não foram encontrados essa diferença em ambos os grupos infectados em relação ao grupo controle.

Para a citocina IL-10, houve um aumento dos níveis, no coração dos animais infectados pelo isolado Be-78is. Tanto TGF- β quanto IL-10 são citocinas anti-inflamatórias que atuam principalmente no controle de proliferação e diferenciação celular sendo, na DCh, importantes na inflamação e fibrose. Silva et al., (2019), em análises *in vitro*, mostraram que cardiomiócitos tratados com tetrandrina, inibem a proliferação de fibroblastos cardíacos induzidos pelo TGF- β , sendo fator importante no redimensionamento de tratamentos para fibrose cardíaca. Nossos resultados mostram que em ambos os grupos infectados não houve aumento dessa citocina, porém nos animais infectados pela cepa Be-78 parental embora haja parasitismo tecidual aumentado e uma resposta imune não significativa, o intenso processo inflamatório na fase aguda foi capaz de gerar neoformação de colágeno no coração, na fase crônica recente. Como o tecido já foi reparado e a resposta imune encontra-se em homeostase, não seria necessária a elevação dos níveis de TGF- β . Salvador et al., (2019) em um estudo feito com pacientes que apresentaram PCR positiva para *T. cruzi* mostrou níveis medianos de IL-10, mostrando que essa citocina desempenha papel importante no controle do parasitismo. Nossos dados mostram que os animais infectados pelo isolado Be-78is, apresentaram maior produção de IL-10 que provavelmente foi capaz de imunomodular o efeito citotóxico da resposta inflamatória, causando redução do parasitismo tecidual sem presença de maiores danos teciduais.

Em relação aos resultados da análise de colágeno tipo I, reticular, importante nos eventos iniciais da deposição de fibrose, houve um aumento no coração dos animais infectados pela cepa Be-78 parental. Esse aumento de colágeno pode ser relacionado a intenso processório inflamatório encontrado na fase aguda (Nogueira-Paiva, 2015), no qual na fase crônica essa inflamação diminui, e o tecido foi reparado por fibrose. Esse processo de reparo tecidual ocorre de forma natural, caracterizado por deposição de colágeno dando maior rigidez ao tecido (Zerr, et al., 2016), porém quando este estímulo é mantido por um longo período, o excesso dessa produção dá origem à fibrose que é umas das grandes consequências das complicações clínicas da doença de Chagas, prejudicando a função dos órgãos (Noya-Rabelo et al., 2018; Chen, et al., 2012).

Além da análise de colágeno, outro componente da MEC foi analisado, a laminina. Sabe-se que o *T. cruzi* utiliza componentes da MEC para garantir o sucesso de infecção na célula, sendo importante fator para a entrada do parasito nos tecidos (Fares *et. al.*, 2013) e a hipótese seria se na fase crônica a laminina poderia estar auxiliando no remodelamento da lesão crônica e assim apresentarem aumentadas. Nossos resultados mostram que animais

infectados pela cepa Be-78 parental e pelo isolado Be-78is não apresentaram diferenças em relação os animais não infectados, ou seja, não houve alteração nos níveis médios de laminina. Coelho et al., (2018), em estudo *in vitro* utilizando a cepa Y, encontraram aumento de MEC (fibronectina, laminina e colágeno) já nas primeiras horas após infecção até 24h após a infecção, suportando a ideia que esse aumento da MEC e desbalanço na degradação possa estar relacionado a fibrose cardíaca na fase crônica da DCh. Já Andrade et al., (1989) analisaram em camundongos alterações da MEC por microscopia de imunofluorescência e mostraram que na fase crônica recente houve aumento das concentrações de laminina que persistiu também durante a fase crônica tardia e relacionaram esse aumento de células inflamatórias. Pereira et al., (2014) mostraram que camundongos infectados pela cepa colombiana na fase crônica apresentaram intenso processo inflamatório cardíaco, bem como uma maior deposição de MEC (fibronectina e laminina). Além disso compararam o modelo experimental, no qual camundongos da linhagem C3H/He apresentaram anormalidades elétricas mais graves do que camundongos C57BL/6 que apresentaram alterações mais brandas (Pereira, et al., 2014). Nossos dados sugerem que, tanto a cepa Be-78 parental quando o isolado Be-78is não foram capazes de alterar a expressão de laminina, no coração e cólon, o que pode estar relacionado a características patogênicas da cepa frente ao modelo experimental utilizado, camundongos da linhagem Balb/c, ou ainda à fase crônica recente, 90 DAI, o que pode não ter sido suficiente para observar alterações nesse componente da MEC.

Além das alterações nos componentes da MEC, nós avaliamos também o impacto da infecção com a cepa policlonal parental e seu isolado sobre as junções do tipo *gap*, reponsáveis pela manutenção do sincício celular cardíaco, importante para a condução sincronizada do impulso elétrico. Componente das junções do tipo Gap, juntamente com as conexinas 40 e 45, a conexina-43, predominantemente expressa no tecido muscular cardíaco, (Kumar e Gilula, 1996) foi analisada através de microscopia confocal. Não houve alteração na expressão de conexina-43 nos animais infectados em comparação aos animais não infectados. Dados na literatura mostram que na fase aguda a expressão da conexina é aumentada devido presença de processo inflamatório no tecido, como forma de reposição dessas conexinas refletindo em uma remodelação patológica no tecido ao dano tecidual (Burke et al, 2014). Adesse et al., (2008) mostraram que a expressão de conexina-43 é aumentada na fase inicial da infecção de miócitos cardíacos, em experimento *in vitro*, porém, após 24h, os níveis de conexina-43 diminuem devido à multiplicação dos parasitos nas

células, o que sugere a infecção pelo *T. cruzi* fator importante na remodelação da expressão dessas proteínas.

Os dados obtidos neste trabalho, associados àqueles observados na fase aguda da infecção nos permitem concluir que, os animais infectados pela cepa Be-78 parental mantiveram a carga parasitária no coração ao longo da infecção, no entanto, aos 90DAI, o processo inflamatório, exuberante na fase aguda e capaz de gerar dano tecidual reparado com uma discreta fibrose, foi controlado, sugerindo uma situação de equilíbrio parasito-hospedeiro, que pode estar relacionada à presença de amastigotas quiescentes, incapazes de gerar estímulo antigênico necessário à inflamação, portanto, “protegidas” do efeito citotóxico da resposta imune celular. Em contrapartida, os animais infectados pelo isolado Be-78is que, na fase aguda da infecção, apresentavam um histotropismo preferencial para o cólon e uma resposta imune aparentemente controlada no coração, demonstraram, aos 90DAI, Em detrimento do processo inflamatório imunomodulador sustentado na fase crônica, nenhuma alteração nos componentes da MEC avaliados foi observada, o que ser associado ao aumento da produção da citocina imunomoduladora IL-10, cuja função ao modular a resposta imune é controlar o efeito citotóxico da imunidade celular.

Em suma, podemos sugerir que, no coração, o isolado Be-78is parece apresentar um perfil atrasado em relação à cepa Be-78 parental, que pode estar relacionado a uma patogenicidade inferior, compatível com a menor parasitemia observada nesse grupo (Nogueira-Paiva, 2015). Todavia, avaliações em tempos mais tardios da fase crônica da infecção, com essas duas populações do *T. cruzi*, poderiam revelar outros aspectos importantes para a patogênese das lesões da DCh, relacionados, por exemplo, ao desbalanço da relação parasito-hospedeiro observada no grupo infectado com a cepa Be-78 parental, com indução de uma resposta imune contra as formas “quiescentes” do parasito e desenvolvimento de lesões teciduais exuberantes resultantes da tentativa de reduzir a carga parasitária. Em relação ao grupo de animais infectados com o isolado Be-78is, análises adicionais na fase crônica tardia poderiam confirmar sua menor patogenicidade comparada à cepa parental, ou ainda, evidenciar que essa subpopulação possa induzir uma infecção mais silenciosa e lenta, entretanto, capaz de causar dano tecidual, resultado de uma resposta imune sustentada ao longo da fase crônica da infecção.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que no coração, o isolado Be-78is parece apresentar um perfil atrasado em relação à cepa Be-78 parental, podendo estar relacionado a uma patogenicidade inferior ou até mesmo por apresentar uma infecção mais silenciosa, sendo necessárias análises mais tardias que poderiam evidenciar melhor as lesões causadas nos casos clínicos na DCh.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESSE, D., et al. Gap Junctions and Chagas Disease. **Chagas Disease**, Part B, 63–81, 2011.
- ADESSE, D., GARZONI, L. R., HUANG, H., TANOWITZ, H. B., MEIRELLES, M. N., SPRAY, D. C., *Trypanosoma cruzi* induces changes in cardiac connexin43 expression. **Microbes and Infection**. 10:21-28, 2008.
- ALMEIDA, V. L. L. Papel de citocinas e da leptina na imunopatologia da fase aguda na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos nocautes para IL-4 e IFN- γ . 2017. 66 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública)** - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- ALVAREZ, M.N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intrapagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-derived Cytotoxin against Internalized *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol Chem**. 286: 6627-6640, 2011.
- ALVES CUNHA, E. L., et al. Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. **Experimental Parasitology**, 2019.
- ANDRADE, D. V., GOLLOB, K. J., & DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(7), 2014.
- ANDRADE, L. O., MACHADO, C. R., CHIARI, E., PENA, S. D., MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 100:163-172, 1999.
- ANON. Recommendations from a satellite meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 94 (Suppl. 1), 429–432, 1999.
- ARAÚJO, F. F. de. Avaliação do papel das células T reguladoras CD4+CD25+ nas diferentes formas clínicas da Doença de Chagas. 2009. 133 f. **Tese (Doutorado em Ciências em Biologia Celular e Molecular)-Centro de Pesquisa René Rachou**, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2009.
- BAHIA, M. T., TAFURI, W. L., CALIARI, M. V., VELOSO, V. M., CARNEIRO, C. M., COELHO, G. L. L. M., & LANA, M. DE. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(4), 339–345, 2002.
- BARRETO, B. C. Caracterização da expressão da conexina-43 miocárdica na doença de chagas crônica. 2019. 55f. **Dissertação (Mestrado em Patologia Patologia)**—Universidade Federal da Bahia; Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.
- BARRY, M. A., et al. A therapeutic vaccine prototype induces protective immunity and reduces cardiac fibrosis in a mouse model of chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 13(5), 2019.
- BASTOS C. J.C, et al. Resultados clínicos de treze pacientes com doença de Chagas aguda adquirida por transmissão oral de dois surtos urbanos no Nordeste do Brasil. **PLoS Negl Trop Dis**. 46: e711, 2010.
- BERNARDO, C. R., et al. ABO, Secretor and Lewis histo-blood group systems influence the digestive form of Chagas disease. **Infection, Genetics and Evolution**, 45, 170–175, 2016.

- BERRY, A. S. F., et al. Sexual reproduction in a natural *Trypanosoma cruzi* population. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 13(5), 2019.
- BRENER, Z. Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' Disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 82:205-213, 1987.
- BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 63:215-220, 1969.
- BURKE, S., NAGAJYOTHI, F., THI, M. M., HANANI, M., SCHERER, P. E., TANOWITZ, H. B., & SPRAY, D. C. Adipocytes in both brown and white adipose tissue of adult mice are functionally connected via gap junctions: implications for Chagas disease. **Microbes and Infection**, 16(11), 893–901, 2014.
- BUSTOS, P. L., MILDUBERGER, N., VOLTA, B. J., PERRONE, A. E., LAUCELLA, S. A., & BUA, J. *Trypanosoma cruzi* Infection at the Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected Newborns. **Frontiers in Microbiology**, 10, 2019.
- CARDILLO, F., POSTOL, E., NIHEI, J., AROEIRA, L. S., NOMIZO, A., & MENGEL, J. 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**, 122(4), 584–595, 2007.
- CAROD-ARTAL, F. J. American trypanosomiasis. **Handbook of Clinical Neurology**, 103–123, 2013.
- CARVALHO, A. C. C., MASUDA, M. O., TANOWITZ, H. B., WITTNER, M., GOLDENBERG, R. C. S., & SPRAY, D. C. Conduction Defects and Arrhythmias in Chagas' Disease. **Journal of Cardiovascular Electrophysiology**, 5(8), 686–698, 1994.
- CARVALHO, A. C. C., ROY, C., HERTZBERG, E. L., TANOWITZ, H. B., KESSLER, J. A., WEISS, L. M., WITTNER, M., DERMIETZEL, R., GAO, Y., SPRAY, D. C. Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. **Brain Research** 790:304–314, 1998.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiose humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CHAVES, A. T., et al. Immunoregulatory mechanisms in Chagas disease: modulation of apoptosis in T-cell mediated immune responses. **BMC Infectious Diseases**, 16(1), 2016.
- CHEN, D., et al. Dermal β -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. **Development**. v. 139, p. 1522-1533, 2012.
- CHOWDHURY, I., et al. Gene Expression Profiling and Functional Characterization of Macrophages in Response to Circulatory Microparticles Produced during *Trypanosoma cruzi* Infection and Chagas Disease. **Journal of Innate Immunity**, 9(2), 203–216, 2017.
- CHUNG, A. E., et al. Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. **Cell**, 16(2), 277–287, 1979.
- COELHO P. S., et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. **J. Leukoc Biol.** 2002; 71 : 837-844, 2002.

- COELHO, L. L., PEREIRA, I. R., PEREIRA, M. C. DE S., MESQUITA, L., LANNES-VIEIRA, J., ADESSE, D., & GARZONI, L. R. *Trypanosoma cruzi* activates mouse cardiac fibroblasts in vitro leading to fibroblast-myofibroblast transition and increase in expression of extracellular matrix proteins. **Parasites & Vectors**, 11(1), 2018.
- CRONIER, L.; BASTIDE, B.; DEFAMIE, N.; NIGER, C.; POINTIS, G.; GASC, J. M.; MALASSINE, A. Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta. **Histology and Histopathology**, v. 16, n. 1, p.285-295, 2001.
- CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 252-8, Jul. 2009.
- CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 1-12, 2014.
- 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.
- DE OLIVEIRA, A.P. et al. The role of CCR5 in Chagas disease - a systematic review. **Infect Genet Evol**, v. 45, p. 132-37, Nov. 2016.
- DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol**, v. 21, n. 1, p. 35-41, 2005.
- DIAS, J. C. P et al. Surto agudo da doença de Chagas associado à transmissão oral . Rev Soc Bras Med Trop 41 : 296-300, 2008.
- DIAS, J. C. P. Controle da doença de Chagas. Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. In: JCP Dias, JR Coura (eds), Rio de Janeiro, **Editora FIOCRUZ**, p. 453-468, 1997.
- DOPICO, E., et al. Immune reactivity to *Trypanosoma cruzi* chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting. **BMC Infectious Diseases**, 19(1), 2019.
- 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.
- FARES, R. C. G., et al. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Differentially Expressed in Patients with Indeterminate and Cardiac Clinical Forms of Chagas Disease. **Infection and Immunity**, 81(10), 3600–3608, 2013.
- FERRÃO, P. M. Tratamento da fibrose induzida pela infecção por *Trypanosoma cruzi* com composto inibidor da via de TGF- β em modelo tridimensional de cultivo de células cardíacas. 2014. 134f. **Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)** - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2014.
- FILIGHEDDU, M. T., GÓRGOLAS, M., & RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Medicina Clínica**, 148(3), 125–131, 2017.
- GIORDANO, R., CHAMMAS, R., VEIGA, S. S., COLLI, W., & MARIA JÚLIA M, A. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 65(1), 85–94, 1994.

- GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**. 04.008, 2019.
- GUEDES, P. M. M., VELOSO, V. M., CALIARI, M. V., CARNEIRO, C. M., SOUZA, S. M., LANA, M., CHIARI, E., BAHIA, M. T., GALVÃO, L. M. C. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102:149:147, 2007.
- HUANG H., et al. Infection of endothelial cells with *Trypanosoma cruzi* activates NF-kappaB and induces vascular adhesion molecule expression.. **Infect Immun**. 1999; 67 : 5434-5440, 1999.
- KAYAMA H, TAKEDA K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect**. 12(7):511-7, 2010.
- KOSTIN S, et al. Gap junction remodeling and altered connexin-43 expression in the failing human heart. **Mol Cell Biochem**.; 242(1-2):135-44, 2003.
- KUMAR, N. M., & GILULA, N. B. The Gap Junction Communication Channel. **Cell**, 84(3), 381–388, 1996.
- LANA, M. Caracterização do *Trypanosoma cruzi*, cepa Berenice, isolada da mesma paciente em diferentes períodos. 91 (PhD). Universidade Federal de Minas Gerais, 1981.
- LANA, M. DE, CHIARI, E., & TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 87(1), 59–71, 1992.
- LANA, M. e CHIARI, C. A. Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 81:247-53, 1986.
- LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (editores). **Parasitologia Humana**. 11a ed. São Paulo: Atheneu, p. 85-108, 2005
- 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.
- LEWIS, M. D., FRANCISCO, A. F., TAYLOR, M. C., JAYAWARDHANA, S., & KELLY, J. M. Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. **Cellular Microbiology**, 18(10), 1429–1443, 2016.
- LIJNEN P.J.; PETROV V.V.; FAGARD R.H. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). **Mol Genet Metab**. 71(1-2):418-35, 2000.
- LÓPEZ-MUÑOZ, R. A., MOLINA-BERRÍOS, A., CAMPOS-ESTRADA, C., ABARCA-SANHUEZA, P., URRUTIA-LLANCAQUEO, L., PEÑA-ESPINOZA, M., & MAYA, J. D. Inflammatory and Pro-resolving Lipids in Trypanosomatid Infections: A Key to Understanding Parasite Control. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.
- 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.
- MACHADO, F. S., et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, 34(6), 753–770, 2012.

- MACHADO, F.S. et al. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Front Biosci** (Elite Ed), v. 4, p. 1743-58, 2012^a.
- MANNE J.M, et al. Barriers to Treatment Access for Chagas Disease in Mexico. **PLoS Negl Trop Dis**; 7 (10), 2013.
- MATEUS J., GUERRERO P., LASSO P., CUERVO C., GONZÁLEZ J. M., PUERTA C. J., ET AL. An animal model of acute and chronic Chagas disease with the reticulotropic Y strain of *Trypanosoma cruzi* that depicts the multifunctionality and dysfunctionality of T cells. **Front. Immunol.** 10:918, 2019.
- MATSUDA N. M., et al. Effect of isosorbide dinitrate on gastroesophageal reflux in healthy volunteers and patients with Chagas' disease. **Dig Dis Sci.** 40:177–82, 1995.
- MATTOS, E. C., SCHUMACHER, R. I., COLLI, W., & ALVES, M. J. M. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Fibronectin or Laminin Modifies Tubulin and Paraflagellar Rod Protein Phosphorylation. **PLoS ONE**, 7(10), e46767, 2012.
- MESSENGER, L. A., & MILES, M. A. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, 151, 150–155, 2015.
- MILES, M. A.; CEDILLOS, R. A.; POVOA, M. M.; DE SOUZA, A. A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? **Lancet**, v. 1, p. 1338-40, 1981.
- MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C.; GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 71, p. 217-25, 1977.
- MILES, M.A., et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. **Parasitol**, 136 : 1509-1528, 2009.
- MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunol Lett.**33 : 35–40, 1992
- NÓBREGA, A. A, et al. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí, Brasil . **Emerging Infect Dis** 15 : 653–655, 2009.
- NOGUEIRA-PAIVA, N. C. Influência da infecção por uma cepa policlonal do *Trypanosoma cruzi* sobre a resposta imune no coração e cólon durante a fase aguda da infecção experimental de camundongos. 2015. 133f. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas**, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2015.
- NOGUEIRA-PAIVA, N. C.; FONSECA KDA, S.; VIEIRA, P. M.; DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; MOURA, S. A.; VELOSO, V. M.; GUEDES, P. M.; TAFURI, W. L.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M. Myenteric plexus is differentially affected by infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains in Beagle dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 51-60, 2014.
- NOGUEIRA-PAIVA, N. C.; VIEIRA, P. M.; OLIVERI, L. M.; FONSECA KDA, S.; POUND-LANA, G.; DE OLIVEIRA, M. T.; DE LANA, M.; VELOSO, V. M.; REIS, A. B.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. Host-Parasite Interactions in Chagas Disease: Genetically Unidentical Isolates of a Single *Trypanosoma cruzi* Strain Identified In Vitro via LSSP-PCR. **PLoS One**, v. 10, p. e0137788, 2015.

- NOYA-RABELO, M. M., et al. The Presence and Extension of Myocardial Fibrosis in the Undetermined Form of Chagas' Disease: A Study Using Magnetic Resonance. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2018.
- ORTIZ, J. V., et al. Cardiac Evaluation in the Acute Phase of Chagas' Disease with Post-Treatment Evolution in Patients Attended in the State of Amazonas, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2018.
- PANE, S., et al. Serological evaluation for Chagas disease in migrants from Latin American countries resident in Rome, Italy. **BMC Infectious Diseases**, 18(1), 2018.
- PASSOS, L. S. A., et al. Activation of Human CD11b+ B1 B-Cells by *Trypanosoma cruzi* Derived Proteins Is Associated With Protective Immune Response in Human Chagas Disease. **Frontiers in Immunology**, 9, 2019.
- PEDROSO, A. Cariótipo molecular: uma ferramenta para o estudo analítico e evolutivo do genoma de *Trypanosoma cruzi*. 2004. 141 páginas. **Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.**
- PEREIRA, I. R.; VILAR-PEREIRA, G.; DA SILVA, A. A; LANNES-VIEIRA, J. Fibrogenesis and Collagen Resorption in the Heart and Skeletal Muscle of *Calomys callosus* Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*: immunohistochemical Identification of Extracellular Matrix Components. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. vol.109 no.3 Rio de Janeiro, maio 2014.
- PINHEIRO, S. W., et al. Morphometric study of the fibrosis and mast cell count in the circular colon musculature of chronic Chagas patients with and without megacolon. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(4), 461-466, 2003.
- PINO-MARTÍNEZ, A. M., MIRANDA, C. G., BATALLA, E. I., GONZÁLEZ-CAPPA, S. M., & ALBA SOTO, C. D. IL-10 participates in the expansion and functional activation of CD8+ T cells during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Leukocyte Biology**, 2018.
- PISSETTI, C. W., et al. Association between the plasma levels of TNF- α , IFN- γ , IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. vol.42 no.4 Uberaba July/Aug. 2009.
- PRATA A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, 1:92-100, 2001
- RASSI A JR, et al. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **N Engl J Med**. 355(8):799-808, 2006.
- RASSI, A., RASSI, A., & MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, 375(9723), 1388-1402, 2010.
- REZENDE, J. M.; LUQUETTI, A. O. Chagasic megavisceras. In: (Ed.). Chagas' disease and the nervous system. **Pan American Health Organization, Washington, DC**, p.149-171, 1994.
- ROMANHA, A. J.; DA SILVA PEREIRA, A. A.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. **Comp Biochem Physiol B**, v. 62, p. 139-42, 1979.
- SALGADO, J. A., GARCEZ, P. N., OLIVEIRA, C. A., GALIZZI, J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito de Doença de Chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 4:330-337, 1962.

SCHMITZ, V., et al. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. **J. Leukoc Biol.** 85 : 1005-1014, 2009.

SEVERS N. J., et al. Gap junction alterations in human cardiac disease. **Cardiovasc Res.**; 62(2):368-77, 2004.

SILVA, T. A., FERREIRA, L. F. DE C., PEREIRA, M. C. DE S., & CALVET, C. M.. Differential Role of TGF- β in Extracellular Matrix Regulation During *Trypanosoma cruzi* Host Cell Interaction. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(19), 4836, 2019.

STEINDEL M, PACHECO LK, SCHOLL D, M SOARES MORAES, et al. Caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolado de vetores humanos e reservatórios de animais após um surto de doença de Chagas humana aguda no estado de Santa Catarina, Brasil. **Diagn Microbiol Infect Dis** 60 : 25–32, 2008.

STURM, N. R., & CAMPBELL, D. A. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, 115(1-2), 35–43, 2010.

TAFURI W. L. Alterações ultra-limitadas dos componentes muscular, intersticial e nervoso do coração e intestinos na doença de Chagas experimental e humana. **Tese de Professor Titular**. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1974.

TEIXEIRA, A. A. R., DE VASCONCELOS, V. DE C. S., COLLI, W., ALVES, M. J. M., & GIORDANO, R. J. *Trypanosoma cruzi* Binds to Cytokeratin through Conserved Peptide Motifs Found in the Laminin-G-Like Domain of the gp85/Trans-sialidase Proteins. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 9(9), 2015.

TIBAYRENC, M.; HOFFMANN, A.; POCH, O.; ECHALAR, L.; LE PONT, F.; LEMESRE, J. L.; DESJEUX, P.; AYALA, F. J. Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p. 442-7, 1986.

TOSELLO, B. J., et al. IL-17RA-signaling modulates CD8+ T cell survival and exhaustion during *Trypanosoma cruzi* infection. **Front. Immunol.** 9, 2347, 2018.

TRAVERSO, L., SIERRA, I., STERKEL, M., FRANCINI, F., & ONS, S. Neuropeptidomics in *Triatoma infestans*. Comparative transcriptomic analysis among triatomines. **Journal of Physiology-Paris**, 110(3), 83–98, 2016.

VALADARES, H. M. S., PIMENTA, J. R., SEGATTO, M., VELOSO, V. M., GOMES, M. L., CHIARI, E., GOLLOB, K. J., BAHIA, M. T., LANA, M., FRANCO, G. R., MACHADO, C. R., PENA, S. D. J., MACEDO, A. M. Unequivocal Identification of Subpopulations in Putative Multiclonal *Trypanosoma cruzi* Strains by FACs Single Cell Sorting and Genotyping. **PLoS Neglected Tropical Disease**, 6:e1722, 2012.

VELOSO, V. M., GUEDES, P. M. M., LANA, M., MARTINS, H. R., CARNEIRO, C. M., CÂMARA, A. C. J., D'ÁVILA, D. A., CALDAS, I. S., GALVÃO, L. M. C., CHIARI, E., BAHIA, M. T. Genetic modulation in Be-78 and Y *Trypanosoma cruzi* strains after long-term infection in Beagle dogs revealed by molecular markers. **Infection, Genetics and Evolution**, 12:1128-1135, 2012.

VELOSO, V. M.; ROMANHA, A. J.; LANA, M.; MURTA, S. M.; CARNEIRO, C. M.; ALVES, C. F.; BORGES, E. C.; TAFURI, W. L.; MACHADO-COELHO, G. L.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. **Parasitol Res**, v. 96, p. 382-9, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease control and prevention in Europe. Report of a WHO Informal Consultation, 2019.

YAROVINSKY F, et al. TLR11 Activation of Dendritic Cells by a Protozoan Profilin-Like Protein. **Science**. 308 : 1626-1629, 2005.

ZERR, P., et al. Sirt1 regulates canonical TGF- β signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis. **Ann Rheum Dis**. v. 75, p. 226-33, 2016.

ZINGALES, B., et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-4, 2009

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1: Certificado CEUA



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559 -1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/29, intitulado "*Influência da infecção por uma cepa policlonal do Trypanosoma cruzi sobre as lesões cardíaca e digestiva na infecção experimental de camundongos BALB/c.*", que tem como responsável a Profa. Dra. Claudia Martins Carneiro, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 01/12/2017.

Ouro Preto, 2 de dezembro de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP

9.2 Anexo 2: Representação dados da fase aguda

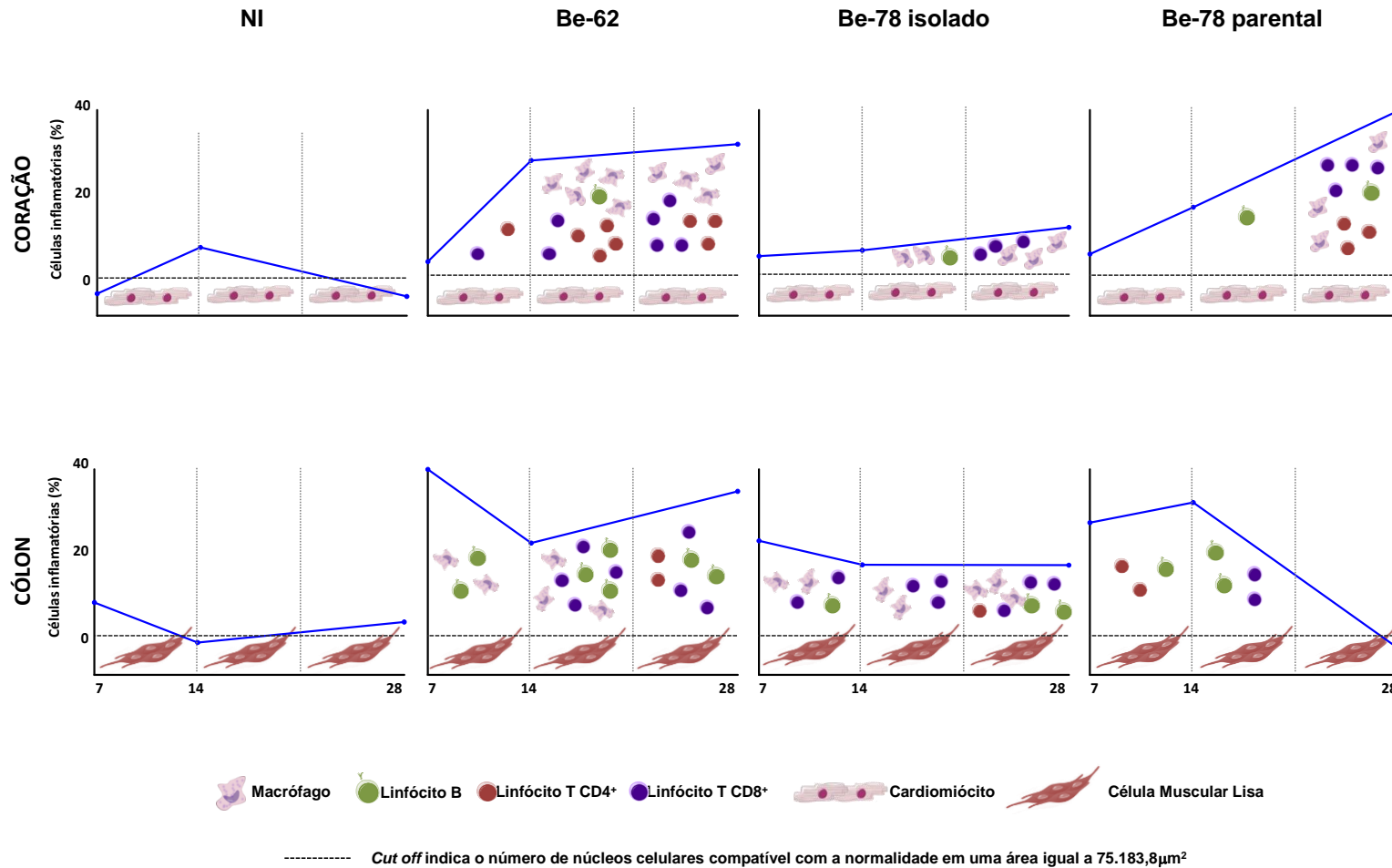


Figura 16: Representação esquemática dos resultados obtidos na ETAPA II da tese de doutorado Nívia Carolina Nogueira de Paiva, 2015. Análises de imunofenotipagem e carga parasitária no coração e cólon de camundongos BALB/c eutanasiados ao longo da fase aguda (7, 14 ou 28 dias após a infecção -dai) da infecção experimental com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*. NI: grupo de animais não-infectados; Be-62: grupo de animais infectados com a cepa Be-62; Be-78 isolado: grupo de animais infectados com o isolado Be-78is5-3mai; Be-78 parental: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78 (Nogueira-Paiva, 2015).

9.3 Anexo 3: Representação dados da fase aguda

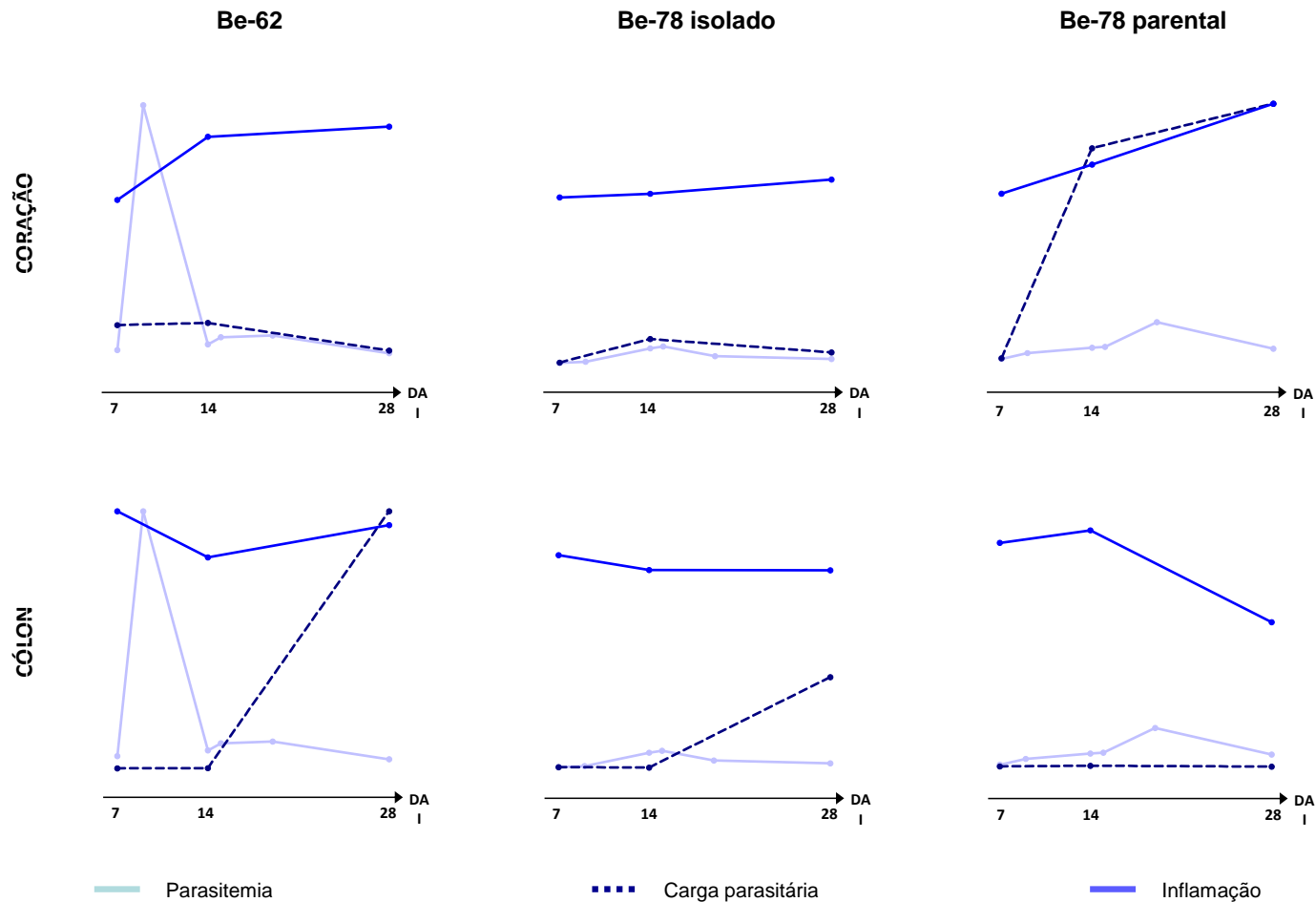


Figura 17: Representação esquemática dos resultados obtidos na ETAPA II da tese de doutorado Nívia Carolina Nogueira de Paiva, 2015. Análises de parasitemia, carga parasitária e inflamação no coração e cólon de camundongos BALB/c eutanasiados ao longo da fase aguda (7, 14 ou 28 dias após a infecção-dai) da infecção experimental com o isolado Be-78is, ou com as cepas de referência Berenice-62 e Berenice-78 parental do *Trypanosoma cruzi*. NI: grupo de animais não-infectados; Be-62: grupo de animais infectados com a cepa Be-62; Be-78 isolado: grupo de animais infectados com o isolado Be-78is5-3mai; Be-78 parental: grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78 (Nogueira-Paiva, 2015).